

UNTERSUCHUNGEN ZUR EINSETZBARKEIT DES
OPTISCHEN AUFHELLERS BLANKOPHOR BA 267% ALS
FLUOROCHROM IN DER MYKOLOGISCHEN DIAGNOSTIK

CLAUDIA GRABL

1986

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr.h.c. O.Braun-Falco

UNTERSUCHUNGEN ZUR EINSETZBARKEIT
DES OPTISCHEN AUFHELLERS BLANKOPHOR BA 267 %
ALS FLUOROCHROM IN DER MYKOLOGISCHEN DIAGNOSTIK

vorgelegt von
Claudia Graßl

aus
Uffing am Staffelsee

Jahr
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. O. Braun-Falco

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 06. 1986

Mit Dank und Freude

meinen Eltern gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554635_0003

INHALTSVERZEICHNIS

=====

A.	<u>Einführung</u>	1
B.	<u>Grundlagen</u>	
1.	Allgemeine Ergebnisse der Fluoreszenz- mikroskopie, insbesondere in der Mykologie	3
2.	Optische Aufheller als Vitalfluorochrome	8
C.	<u>Material und Methoden</u>	
1.	Die Fluoreszenzmikroskope	12
2.	Die Fluoreszenz	16
3.	Der optische Aufheller Blankophor BA 267%	19
4.	Die Färbemethoden	21
5.	Das Untersuchungsgut	22
6.	Die Kalilaugenpräparation	23
7.	Die Fluoreszenz-Mikrophotographie	24
D.	<u>Untersuchungen und Ergebnisse</u>	
1.	Vergleichende Untersuchung zwischen Nativpräparaten und BPBA fluoro- chromierten Präparaten	25
2.	Gegenüberstellung der mikroskopischen Ergebnisse und der Kulturbefunde	26

3.	Vergleich des Pilznachweises bei 200 mit BPBA 0,2% fluorochromierten Präparaten im Durchlicht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskop	30
4.	Vergleich des Pilznachweises bei 200 mit BPBA 0,04 % fluorochromierten Präparaten im Durchlicht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskop	31
5.	Prüfung der Pilznachweisbarkeit des vier Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrten Untersuchungsmaterials bei Fluorochromierung mit BPBA 0,2 % bzw. BPBA 0,04 %	33
6.	Prüfung der Pilznachweisbarkeit bei 30 mit BPBA 0,2% fluorochromierten und versiegelten Präparaten im Verlauf von acht Wochen	35
7.	Prüfung der Pilznachweisbarkeit bei 30 mit BPBA 0,04% fluorochromierten und versiegelten Präparaten im Verlauf von acht Wochen	36
8.	Vergleichende Untersuchungen zwischen mit PAS bzw. BPBA gefärbten histologischen Präparaten	40
9.	Differenzierung zwischen Pilzzellen und Artefakten	41
E.	<u>Diskussion</u>	44
F.	<u>Zusammenfassung</u>	51
G.	<u>Anhang</u>	55
H.	<u>Literaturverzeichnis</u>	71

A. Einführung

Für die Diagnose einer Pilzinfektion der Haut, Nägel oder Haare muß der Nachweis von Pilzelementen im Untersuchungsmaterial geführt werden. Im allgemeinen geschieht dies mittels der Kalilaugenpräparation, die im mikroskopischen Hellfeld durchgemustert wird. Die endgültige Identifizierung der Dermatophyten erfolgt üblicherweise mit Hilfe des kulturellen Nachweises, für den in der Regel ein bis drei Wochen veranschlagt werden müssen.

Trotz aller Fortschritte auf dem Gebiet der Mikroskopie beinhaltet diese Untersuchungsmethode dennoch eine Reihe von Fehlerquellen:

So ist es durchaus möglich, daß im üblichen Kalilaugenpräparat keine Pilzelemente nachgewiesen werden können, obwohl in Wiederholungsuntersuchungen sehr wohl Pilze gefunden werden. Die Ursache dafür liegt zwar meistens in der Abnahme ungeeigneten Materials, jedoch ist sie auch in Schwierigkeiten der mikroskopischen Untersuchungstechnik zu suchen. Andererseits gibt es für Ungeübte zahlreiche Verwechslungsmöglichkeiten mit pilzähnlichen Artefakten, wie z.B. Kalilaugenkristallen, Luftbläschen, Wollfäden oder Mosaikfungi. Zudem lassen sich z.B. Sproßpilze im Schuppenmaterial der Kalilaugenpräparate nicht oder nur schlecht nachweisen.

Deshalb versucht man seit langem, andere mikroskopische Untersuchungsverfahren, wie z. B. die Fluoreszenzmikroskopie einzusetzen. Dafür stehen seit Jahrzehnten eine Reihe von Fluorochromen wie z.B. Akridinorange zur Verfügung.

In den letzten 20 Jahren wurden verstärkt auch optische Aufheller wie Calcofluorweiß (CFW) zur Vital-

fluorochromierung von Zellstrukturen benutzt. Da CFW jedoch nicht mehr erhältlich ist, findet seit ein paar Jahren der optische Aufheller Blankophor BA 267% (BPBA) der Firma Bayer Leverkusen Anwendung als Fluorochrom.

In dieser Arbeit wurde der Weißmacher BPBA auf seine Einsatzmöglichkeit für die mykologische Forschung und Diagnostik untersucht. Unter Verwendung von BPBA-Lösungen sowohl in 0,2%-iger als auch 0,04%-iger Konzentration sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Unterschiede beim Pilznachweis bei KOH- bzw. BPBA-Präparaten?
- Unterschiede bei Verwendung eines Auflicht- bzw. Durchlichtmikroskops?
- Einfluß der BPBA-Konzentration auf Pilznachweis und Abbildungsqualität?
- Einfluß auf die Abbildungsqualität durch längere Aufbewahrung versiegelter BPBA-Präparate?
- Einfluß zeitlicher Unterschiede zwischen Entnahme und Verarbeitung des Untersuchungsmaterials?

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde zwischen 1983 und 1985 im mykologischen Labor und Forschungslabor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München durchgeführt. Die schriftliche Ausarbeitung erfolgte im Frühjahr 1986.

B. Grundlagen

1. Allgemeine Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie insbesondere in der Mykologie.

Erstmalig diskutierte *A. Köhler* im Jahre 1910 die Anwendungsmöglichkeit der Fluoreszenz im Bereich der Mikroskopie (aus Lit.: 41).

C. Reichert (1911) und *H. Lehmann* (1913) beschrieben unabhängig voneinander fluoreszenzmikroskopische Einrichtungen (aus Lit.: 4).

Es war vor allem *Max Haitinger*, der sich um eine systematische Bearbeitung dieses Gebietes verdient gemacht hat und es mit verbesserten Apparaten für den Bereich der Histologie erschloß (aus Lit.: 15).

Durch die Untersuchungen von *S. Strugger* gewann vor allem das Akridinorange für die Protoplasmaforschung eine große Bedeutung (aus Lit.: 45).

Die Ergebnisse wurden durch die Arbeiten von *F. Dangel* im wesentlichen bestätigt (aus Lit.: 9).

S. von Prowazek's Veröffentlichung im Jahre 1914 zeigte das Problem der sekundären Fluoreszenzmikroskopie auf (aus Lit.: 38). Er war aber damals noch nicht in der Lage, dies in der Praxis zu realisieren, denn ihm fehlten nahezu alle technischen Hilfsmittel. Von seinen Studien mit Chinin, Eosin, Fluorescein und Neutralrot als Fluorochrome leitete sich später die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen für zytologische Zwecke ab.

H. Johannes verwendete erstmalig fluoreszierende Farbstoffe zur protoplasmatischen Analyse von Pilzmycelien: 1939 und 1941 kam Neutralrot zur Anwendung, 1949 Akridinorange (aus Lit.: 24).

Als richtungsweisend auf dem Gebiet der Mykologie sollten sich die Experimente von Janke (1951) und Flegel (1954) erweisen: Nach *D. Janke* besteht eine Beziehung zwischen der isoelektrischen Zone der Eiweißkörper von verschiedenen Mikroorganismen und der Anfärbbarkeit mit einem kationischen Fluorochrom wie z.B. dem Akridinorange, das im dissoziierten Zustand oberhalb des isoelektrischen Punktes im neutralen bis schwach sauren Bereich maximal fluoresziert. Oberhalb von pH 9 liegt keine Dissoziation mehr vor. Folglich tritt keine Absorption von Kationen mehr ein, sondern es fluoresziert jetzt die lipophile Farbbase. Dieser Effekt stellte sich als geeignet für die Fluorochromierung von Dermatophyten heraus. Janke wies auch auf die guten Resultate des fluoreszenzmikroskopischen Pilznachweises mit Akridinorange hin (aus Lit.: 22).

Die Ergebnisse von Janke konnten 1954 durch *H. Flegel* bestätigt werden. Er veröffentlichte zudem eine von ihm modifizierte und verbesserte Färbetechnik mit Akridinorange sowie eine Methode zur Anfertigung von Dauerpräparaten mit Akridinorange (aus Lit.: 12). In der Folgezeit fanden dann eine Reihe von anderen Färbetechniken, die das Schiff'sche Reagens oder die Silberimprägnation verwendeten, in der histopathologischen Untersuchung von Mykosen Anwendung: *A.M. Kligman* veröffentlichte 1951 die modifizierte Hotchkiss-McManus-Färbung zum histologischen Pilznachweis (aus Lit.: 30), und auch *M.F. Gridley* (1953) beschrieb eine neue Färbetechnik mit Schiff'schem Reagens zu diesem Zweck (aus Lit.: 13).

R.G. Grocott (1955) hingegen verwendete die Methenamin-Silbernitrat-Technik nach Gomori zur Anfärbung von Pilzmycelien (aus Lit.: 14).

1958 beschrieben *Hicks* und *Matthaei* zum ersten Mal eine selektive Fluoreszenzfärbetechnik von Muzin, indem sie Eisenhämatoxylin als löschendes Agens verwendeten, das Gewebe dann mit Akridinorange färbten und es unter Blauviolettlicht beobachteten (aus Lit.: 19).

Zufällig fanden *J. Pickett et al.* 1960, daß man mit der Technik von *Hicks* und *Matthaei* auch Pilze in Hautschuppen, Haaren und Nägeln gut unter Blauviolettlicht darstellen kann. Diese Beobachtung führte zu weiteren Studien und Anwendungen (aus Lit.: 37).

E.W. Chick et al. studierte mit dieser Technik verschiedene Dermatophyten und kam zu dem Schluß, daß diese Methode mit zu den zuverlässigsten Möglichkeiten der Diagnostik von Mykosen zu zählen sei. Er betonte, daß Verwechslungsmöglichkeiten zwischen pilzähnlichen Artefakten und Pilzmycelien bei dieser Technik kaum zu befürchten seien, im Gegensatz zur Hellfeldmikroskopie. Durch die Verwendung von 2 Blaufiltern vor der Lichtquelle und 2 Blau- oder Gelbfiltern am Mikroskop biete sich zudem die Möglichkeit, problemlos auf die Hellfeldebetrachtung umzuschalten (aus Lit.: 7)

N. Krog untersuchte 1963 Lebensmittel fluoreszenzmikroskopisch und konnte dabei die Fluoreszenzfarben von Fett, Protein und Stärke bei der Anwendung von verschiedenen Fluorochromen tabellarisch erfassen (aus Lit.: 31).

1964 befaßte sich *Chr. Schönborn* mit der Überlegung, welchen Stellenwert die Fluoreszenzmikroskopie für die Hefeschnelldiagnostik habe und kam zu dem Ergebnis, daß diese Methode zwar rasch eine Aussage über den Hefebefall der Haut zuläßt, man aber nicht umhin kommt, sie - um klinischen Anforderungen gerecht zu werden - mit kulturellen Methoden zu ergänzen (aus Lit.: 42).

H. Rusch prüfte 1965 in seiner Dissertation ausführlich die Anwendbarkeit der Fluoreszenzmikroskopie zum verbesserten Nachweis von Dermatophyten und sah in ihr Vorteile für dieses Aufgabengebiet. Die routinemäßige Diagnostik mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden scheitere jedoch an den Kosten für die notwendigen Apparaturen (aus Lit.: 41).

Auch *R. Kaden* kam in seinen Studien 1969 zu dem Schluß, daß mit Akridinorange die eindrucksvollsten Resultate erreicht werden könnten, die Methode an sich im Bereich der Mykologie einen gewissen Fortschritt bedeute, sie sich aber nicht für die tägliche Routineuntersuchung in der Praxis eigne (aus Lit.: 26).

Den Nachweis pathogener Pilze in formalinfixierten Geweben mittels der Immunfluoreszenztechnik demonstrierten *W. Kaplan et al.* Sie zeigten weiterhin die Möglichkeit auf, diese Pilze auch anfärben zu können, wenn die Präparate bereits mit der HE-, Brown und Brenn- oder auch Giemsa-Methode gefärbt waren (aus Lit.: 29).

Auch *J. Raskin* berichtete 1974 über die Anwendbarkeit der Fluoreszenzmikroskopie in der Mykologie. Er verwendete Akridinorange als Fluorochrom und beschrieb die einfache und rasche Handhabung der Methode sowie die brillante Darstellung der Pilzelemente. Er sah die Möglichkeit, diese Technik für Demonstrations-Präparate zu verwenden. Die Fluoreszenzmethode könne zwar nicht die Routinediagnostik mittels Serologie und Kulturen ersetzen, aber sie sei doch eine wertvolle Ergänzung in der mykologischen Diagnostik und Forschung (aus Lit.: 40).

S.A. Quadripur äußerte 1976 die Meinung, daß die Vitalfluorochromierung mittels Akridinorange Eingang

in die mykologische Routinediagnostik finden sollte, denn die Methode sei - wie es auch viele Vorgänger beschrieben hatten - einfach, schnell und daher auch in kleinen Praxen durchführbar. Diese Technik sollte wenigstens als zusätzliche Diagnostik in Erwägung gezogen werden, denn auch weniger oder nicht Geübte könnten die Dermatophyten leicht erkennen (aus Lit.: 39).

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden zudem Tests entwickelt, die zur Untersuchung der Lebensfähigkeit von Pilzen dienen. So berichtete *V.L.G. Calich* 1978 vom FDA-EB (Fluoreszein Diacetat-äthidium Bromid)-Test, mit dem erfolgreich die Lebensfähigkeit von Hefen und hefeähnlichen Zellen untersucht wurden. Sie beobachtete bei lebenden Pilzen eine grüne, bei toten hingegen eine rote Aufleuchtung unter dem UV- Mikroskop. Dieses Ergebnis hätte eine gute Korrelation zu den Resultaten der Koloniezähltechnik gehabt, hätte jedoch den Vorteil einer schnellen, hoch sensitiven und einfachen Technik (aus Lit.: 5).

Ein anderer Test, von *P. Auger* 1979 beschrieben, nutzte die unterschiedliche Affinität toter Zellen zu Rhodamin B und zeigte im Vergleich zum Standard-Verfahren mittels des Methylenblau-Ausschluß-Tests eine ähnliche Spezifität. Hierbei wurde ein Medium hergestellt, das den Farbstoff enthielt und somit gute Bedingungen für Aufnahme und Intensität der Fluoreszenz schuf. So kam Auger zu dem Schluß, daß diese Technik sich als nützlich erweisen würde im Studium der Wirkung von Medikamenten auf pathogene Hefen (aus Lit.: 2).

R.A. Allan und *J.J. Miller* untersuchten in vitro den Einfluß von S-Adenosylmethionin und anderen Aminosäuren auf die Fluoreszenz von Polyphosphaten in Hefeva-

kuolen, die durch das Fluorochrom 4,6-Diamidino-2-phenylindol 2 HCl (DAPI) ausgelöst wurde. Es stellte sich heraus, daß als Fluorochrom zur Anfärbung von Hefenuclei Mithramycin besser war als DAPI, da die Nuclei wesentlich intensiver angefärbt wurden und es keine Fluoreszenz bei anderen in den Zellen enthaltenen Materialien auslöste (aus Lit.: 1).

Eine andere Methode zur Darstellung von Pilzen wurde 1982 von *L. Murgatroyd* beschrieben. Er verwendete 2-Hydroxystilbamidine-Isotionat zur selektiven Pilzdarstellung und stellte fest, daß es sich dabei um eine einfache und schnelle Methode zur Anfertigung von Fluoreszenzpräparaten handelte (aus Lit.: 35). Auch in der Tiermedizin fanden fluoreszenzmikroskopische Methoden zum Nachweis von Pilzen Anwendung, wie *M. Lavička* es 1982 beschrieb (aus Lit.: 32).

2. Optische Aufheller als Vitalfluorochrome

M. Darken beschäftigte sich eingehend mit der Anwendungsmöglichkeit optischer Aufheller in der Biologie, die bis dahin nur zur Bleichung von Textilfasern und zum Schutz gegen Vergilben von Papier eingesetzt worden waren (1961, aus Lit.: 10).

Später verwendete *M. Darken* das Dinatriumsalz von 4,4'-bis (4-Anilino-6-bis-(2-Hydroxyäthyl)-amino-*s*-triazin-2-ylamino)-2,2'-Stilben-Disulfonsäure, das als Calcofluorweiß M2R (CFW M2R) bekannt wurde und zur Klasse der DAS- Triazine gehört, sowie 3 weitere Aufheller anderer Klassen zu Untersuchungen über die Absorption und den Transport der optischen Aufheller von Mikroorganismen. Es zeigte sich, daß diese Substanzen sich nicht nur zur Vitalfärbung sondern auch als stabile Marker eigneten, die an Zellen

gebunden und sogar an nachfolgend daraus gewachsene Sub-Kulturen transportiert wurden, ohne daß das Fluorochrom erneut zugesetzt worden wäre. Die Stoffe zeigten eine intensive Fluoreszenz bei einem pH-Wert von 5,0 bis 8,5 und waren, was die Fluoreszenz betraf, durch Bindung an Proteine stabil.

Es stellte sich heraus, daß von den vier getesteten Aufhellern CFW M2R die zufriedenstellendsten Resultate zeigte: gute Löslichkeits- und Bindungseigenschaften, sowie Hitze- und Lichtbeständigkeit. *M. Darken* beobachtete zudem, daß die stabile Fluorbindung an Mikroorganismen, wie z.B. Hefen und anderen Pilzen, über Monate hinweg nachweisbar war und kein Verblasen der intensiven Fluoreszenz zeigte. Deshalb sah sie in dieser Färbemethode eine einfache und nützliche Technik zur Vitalfluorochromierung von Algen und Pilzen (1962, aus Lit.: 11)

Im Unterschied zu den früher verwendeten Fluorochromen, wie Akridinorange, Akriflavin usw. konnte bei CFW M2R keine bakteriostatische oder bakterizide Aktivität nachgewiesen werden. Diese Feststellung nahmen *M. Maeda* und *N. Ishida* zum Anlaß, die Art der Bindung an die Zellwand genauer zu untersuchen. Da optische Aufheller ursprünglich zum Bleichen von Baumwolle hergestellt wurden, lag die Vermutung nahe, daß CFW M2R sich hauptsächlich an Zellulose und Chitin bindet. Sie fanden heraus, daß sich CFW M2R speziell an Hexapyranose-Polymere mit β -Konfiguration bindet, während Polymere mit α -Konfiguration keine Fluoreszenz zeigen (1967, aus Lit.: 34).

B. Harrington und *K. Raper* gelang mit CFW M2R der Nachweis der Präsenz und Lokalisation von Zellulose in den verschiedenen Entwicklungsstadien von Schimmel-

pilzen. Die Fluorochromierung mit CFW M2R stellte sich als eine sensitive Technik zu morphogenetischen Untersuchungen an schleimbildenden Schimmelpilzen heraus, da es in Myxamöben gespeichert wird und nicht toxisch ist (1968, aus Lit.: 16).

F. Nagata und *J. Takebe* untersuchten mit Hilfe von CFW M2R als Fluorochrom für Pflanzenzellwände die Zellwandregeneration und Zellteilung an isolierten Tabakmesophyllprotoplasten (1970, aus Lit.: 36).

Auch *B. Johnson* benutzte zur Vitalfluorochromierung CFW M2R für seine Studien über Zellteilung bei Hefen und sah darin eine nützliche Möglichkeit zur genaueren Forschung auf diesem Gebiet (1974, aus Lit.: 25).

C. Jefferies et al. verwendete den optischen Aufheller CFW M2R in einer Mischung mit Anilinblau zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in vivo von Callose-Ablagerungen sowie zur Schätzung der Länge und Anzahl von Pollenschläuchen bei Pflaumen- und Birnengriffeln. Diese Methode erwies sich als zufriedenstellend, da sie ein schnelleres, leichteres und auch genaueres Arbeiten erlaubte (1974, aus Lit.: 23).

Auch *J. Hughes* beschrieb die brillante Fluoreszenz von optischen Aufhellern wie CFW M2R bei der Anfärbung von Zellwänden höherer Pflanzen, während das Zytoplasma normalerweise ungefärbt blieb. Es wurde sowohl zur Vitalfluorochromierung bei intakten Pflanzen als auch bei mikroskopischen Schnitten eingesetzt und zeigte Bindungen an Zellulose, carboxylierten Polysacchariden und -1,3-Glucanen (1975, aus Lit.: 21).

W. Herth untersuchte den Einfluß von CFW M2R auf den Verlauf der Chitinmikrofibrillenbildung an der Alge *Poterioochromonas stipitata*. Es zeigte sich, daß es eine konzentrationsabhängige Hemmung der Loricabildung gibt. CFW M2R war zwar nicht toxisch für die Zellen, es hemmte jedoch bei einer Konzentration von 2mg/ml CFW M2R die Loricabildung. In niedrigerer Konzentration (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml) wurden fehlerhafte Loricæ gebildet (1980, aus Lit.: 18).

Blankophor BA 267% (BPBA) - ein anderer optischer Aufheller - wurde von *H. Holländer et al.* als Fluorochrom zur Vitalfluorochromierung von Pilzelementen in Gewebeschnitten und klinischen Proben vorgestellt. Sie wiesen auf die Ähnlichkeit von BPBA in der Molekularstruktur zu CFW M2R und die gleichen Bindungseigenschaften wie CFW M2R hin. Zwei Färbeverfahren wurden entwickelt, eines zur Anfärbung von histologischen Schnitten und ein anderes für Haut-, Nagel- oder Haarproben, wobei sich eine brillante Fluoreszenz der Zellwände zeigte. Sie sahen darin eine einfache, schnelle und zuverlässige Methode für die Routinediagnostik in der Mykologie (1984, aus Lit.:20).

C. Material und Methoden

1. Die Fluoreszenzmikroskope

Zur mikroskopischen Beobachtung wurde das Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Orthoplan der Firma Leitz verwendet. Es besteht aus dem universellen Großfeldmikroskop, dem Lampenhaus mit einer Quecksilber-Höchstdrucklampe 200 W und je einem Satz von Erreger- und Sperrfiltern. Die Bandpassfilter BP 340-380 bzw. BP 355-425 als Erregerfilter selektieren aus der Strahlung, die von der Lichtquelle emittiert wird, die für die Anregung der Fluoreszenz nötige Wellenlänge im blauvioletten Bereich. Die Langpassfilter LP 430 bzw. LP 460 als Sperrfilter haben eine für Fluoreszenzlicht optimale Durchgängigkeit, halten aber das vom Präparat gestreute und in das Objektiv eingetretene Erregerlicht zurück.

Da in dieser Arbeit sowohl die Dunkelfeld-Durchlicht- als auch die Auflichtanregung zum Einsatz kamen, seien hier kurz beide Prinzipien erläutert.

Beim *Dunkelfeld-Durchlichtfluoreszenzmikroskop* (siehe Abbildung 1, Seite 13), wird ein Erregerfilter verwendet, um die Wellenlänge der Lichtquelle der Anregungswellenlänge des zu untersuchenden Materials anzugleichen. Im allgemeinen benutzt man dazu einen Immersions-Dunkelfeldkondensor. Damit nur das von den Objektstrukturen stammende Licht vom Objektiv aufgenommen wird, muß die kleinste numerische Apertur des Dunkelfeldkondensors größer als die am Objektiv sein, wodurch sich bei hohen Vergrößerungen das Auflösungsvermögen reduziert.

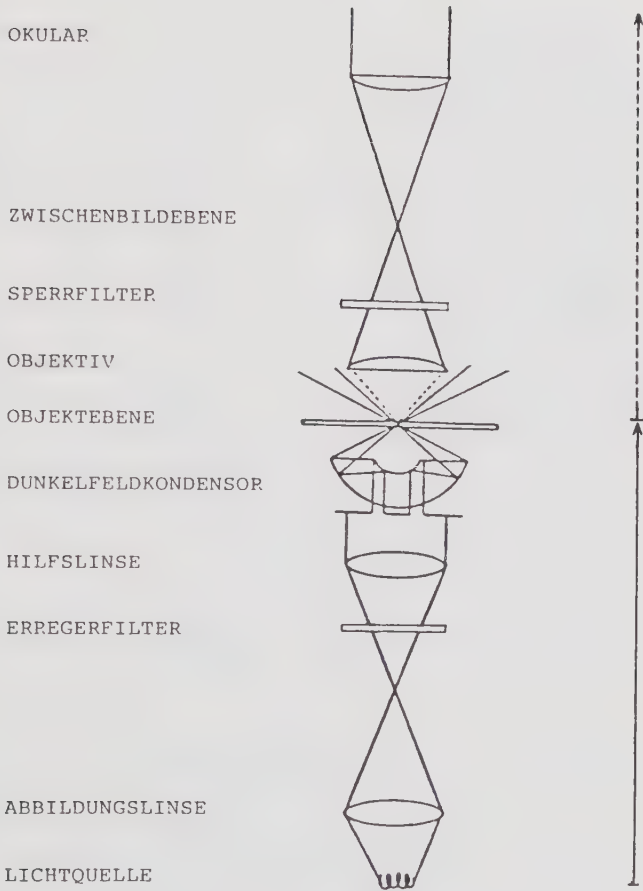


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Dunkelfeld-Durchlichtfluoreszenzmikroskops (nach Lit.: 44)

- Strahlengang von der Lichtquelle zum Objekt
- Strahlengang vom Objekt zum Okular

Der größte Teil des Erregerlichts tritt zwar durch die Objektebene, gelangt jedoch nicht in das Objektiv. Der Rest wird entweder an der Probe gestreut oder absorbiert und als Fluoreszenz abgegeben oder in Wärme umgewandelt. Sowohl das gestreute als auch das Fluoreszenzlicht treffen auf das Objektiv, das ein reelles Bild in der Zwischenbildebene des Mikroskops erzeugt. Objektbezirke, die keine Streuung oder Fluoreszenz hervorrufen, erscheinen schwarz.

Gebrochenes oder gestreutes Erregerlicht, das in das Objektiv einfällt, kann 100- bis 1000- mal intensiver als das Fluoreszenzlicht sein. Deshalb ist zur Bildkontrasterhöhung ein zweites, sogenanntes Sperrfilter nötig, das die nichtfluoreszierenden Wellenlängen des Lichtes entweder reflektiert oder absorbiert. Der Zusatz eines Sperrfilters hinter dem Objektiv führt demzufolge zur fast ausschließlichen Abbildung der fluoreszierenden Objektanteile.

Auch beim *Auflichtfluoreszenzmikroskop* (siehe Abbildung 2, Seite 15) wird das Erregerfilter zur Isolierung der gewünschten anregenden Wellenlänge benötigt. Dieses Anregungslicht trifft auf einen dichromatischen Teilerspiegel, dessen spektrale Eigenschaften auf die notwendigen Anregungsbedingungen optimal abgestimmt sind. Die Wellenlängen, die für die Fluoreszenzanregung zu lang sind, aber dennoch das Erregerfilter passiert haben, transmittieren den dichromatischen Teilerspiegel. Die zur Fluoreszenzanregung benötigten kürzeren Wellenlängen des Anregungslichtes werden vom dichromatischen Teilerspiegel zum Objektiv hin abgelenkt. Dieses fokussiert die Anregungsstrahlung auf die Objektebene.

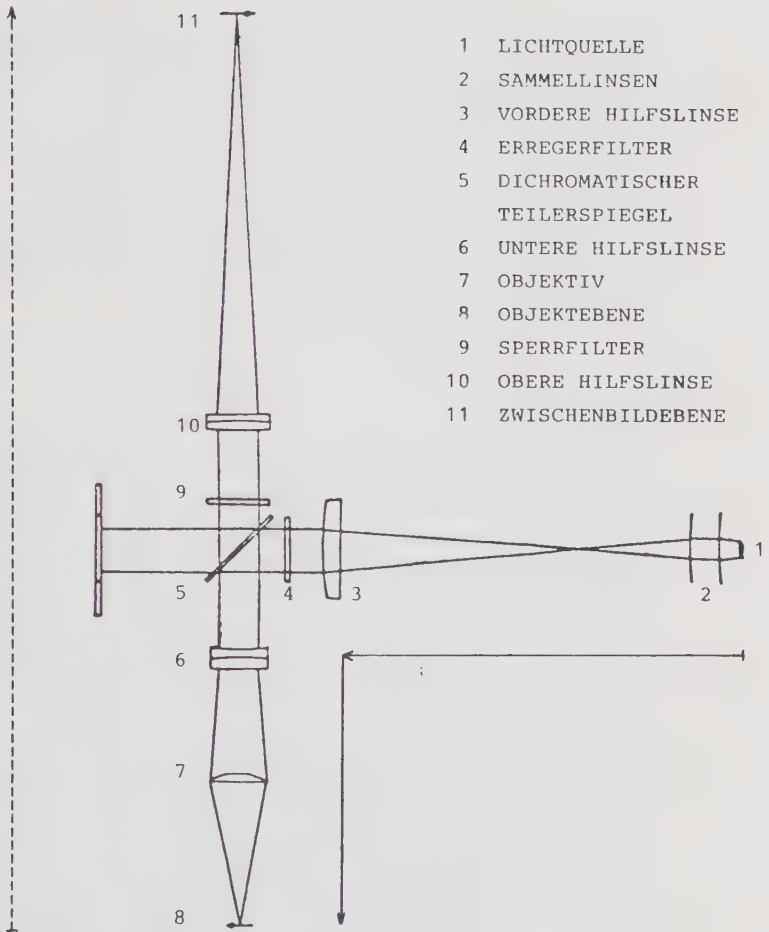


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Auflicht-
 fluoreszenzmikroskops (nach Lit.: 44)

→ Strahlengang von der Lichtquelle zum Objekt
 - - - - - Strahlengang vom Objekt zum Okular

Das von dort in entgegengesetzter Richtung emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht wird erneut vom Objektiv gesammelt, transmittiert den dichromatischen Teilerspiegel und führt zur Abbildung des Objekts.

Auch hier gelangt - wie bei der Durchlichtanregung - nur ein geringer Teil der Anregungsstrahlung zum Sperrfilter. Im Gegensatz zum Durchlichtanregungsverfahren hat dieses System allerdings den Vorteil, daß auch bei Immersionsobjektiven stärkerer Vergrößerung die volle Apertur zur Verfügung steht.

2. Die Fluoreszenz

Die Fluoreszenz ist eine spezielle Erscheinung der Lumineszenz, worunter man den Sammelbegriff für alle Leuchterscheinungen versteht, die nicht auf Wärmezufuhr beruhen. Tritt bei der Absorption von einstrahlendem Licht eine Lichtemission auf, so spricht man von Fluoreszenz, wobei im allgemeinen die Stokesche Regel gilt, daß die anregende Strahlung kurzwelliger als die Fluoreszenzstrahlung ist.

Damit fluoreszierende Substanzen Licht emittieren können, muß vorher Licht absorbiert werden. Diese Absorption hängt vom Elektronengefüge eines Moleküls ab. So bewirken z.B. viele leichtgebundene (-)Elektronen eine längerwellige Absorption. Im relativ langwelligen Bereich absorbieren Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen, Polyenen und Aromaten, sowie jene mit Mesomeriemöglichkeiten, wozu auch die optischen Aufheller gehören. Da Licht nicht kontinuierlich, sondern in Quanten absorbiert wird, kann ein Molekül verschiedene Energiezustände aufweisen, die bei Lichtabsorption besetzt werden können. Diese Energiezustände

unterscheiden sich durch die Elektronenverteilung des Moleküls. Bei den Energiezuständen handelt es sich um Singulett-Zustände (S), das heißt, die Elektronen treten paarweise mit antiparallelem Spin auf. Die Energie der einzelnen Zustände errechnet sich nach $E = h \cdot \nu$. Der erste angeregte Zustand (S_1) zeigt einen großen Energieunterschied zum Grundzustand S_0 , während die nächsten Anregungszustände immer näher zusammenrücken.

Nach Lichtabsorption sind einzelne Energiezustände des Moleküls angeregt, wobei die Energie in diesen Zuständen nur sehr kurz (im allgemeinen 10^{-8} sec.) gespeichert werden kann. Die Energie, die in Form von Licht zugeführt wurde, kann als Licht wieder abgegeben werden oder in andere Energieformen umgewandelt werden (strahlungslose Desaktivierung), z.B. in Wärme. Die Umwandlung der Elektronenanregungsenergie hängt von der Art der Umgebung, der Temperatur des Moleküls und anderen Einflüssen ab.

Bei der Fluoreszenz kehrt das Elektron aus dem niedrigsten Schwingungsniveau des Anregungszustandes S_1 in den Schwingungsgrundzustand S_0 zurück. Dabei wird Fluoreszenzlicht ausgestrahlt. Grund- und Anregungszustand sind Singulettzustände (S, Elektronenpaare mit antiparallelem Spin). Durch Substituenteneinflüsse radikalischer Art kann der Spin des angeregten Elektrons umgekehrt werden, so daß die Elektronen parallelen Spin bekommen. Diesem Molekülzustand kann man eigene Energieorbitale (Tripletzustände = T) zuordnen. Diese Tripletzustände sind wichtig bei der Emission von Phosphoreszenzlicht bei tiefen Temperaturen. Über den ersten angeregten Zustand (S_1) wird der Tripletzustand (T_1) strahlungslos besetzt. Dieser Zustand hat eine längere Lebensdauer von im allgemeinen 10^{-4} sec (siehe Abbildung 3, Seite 18).

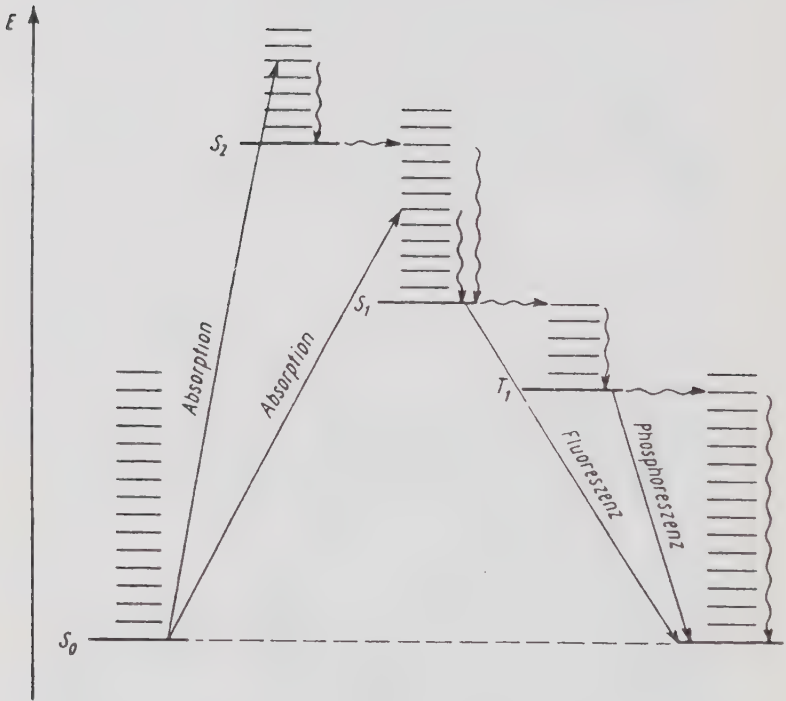


Abbildung 3: Entstehung der Fluoreszenz
Jablonski-Diagramm zu den Umwandlungsmöglichkeiten der Elektroneuanregungsenergie
(aus Lit.: 17)

- $\longrightarrow$ Strahlungsübergänge
 $\rightsquigarrow$ strahlungslose Übergänge
 S_0 Grundzustand
 $S_{1,2}$ Singulettzustände
 T_1 Triplettzustand

Unter Eigenfluoreszenz oder primärer Fluoreszenz versteht man das Auftreten von Fluoreszenzerscheinungen an Materialien in ihrem natürlichen Zustand. Objekte, die nicht fluoreszieren, können durch An- oder Einlagerung von bestimmten Stoffen, die als Fluorochrome bezeichnet werden, zum Leuchten gebracht werden, was man dann als sekundäre Fluoreszenz bezeichnet.

3. Der optische Aufheller Blankophor BA 267%

Der optische Aufheller *Blankophor BA 267 % (BPBA)*, ein kommerzieller Weißmacher von Bayer Leverkusen, BRD, ist ein Derivat der Stilben-Disulfonsäure und findet als Fluorochrom zur Erzeugung einer sekundären Fluoreszenz Anwendung.

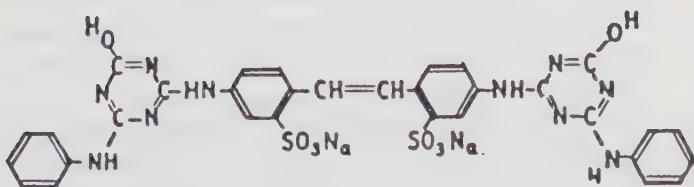


Abbildung 4: Strukturformel von Blankophor BA 267 %
(aus: Lit. 46)

Die Umwandlung von Elektronenanregungsenergie, z.B. kürzerwelligem UV-Licht, in längerwelliges Emissionslicht bewirkt die Fluoreszenz des optischen Aufhellers (Stoke'sche Regel). Es ist für die Fluoreszenz von organischen Verbindungen wichtig, daß Fluoreszenzlöschung und Konkurrenzreaktionen unterdrückt werden. Fluoreszenzlöschung tritt vor allem bei größeren Konzentrationen (10^{-4} mol/l in Lösungen) auf. Diese Konzentrationslöschung ist beispielsweise dafür verantwortlich, daß optische Aufheller in wäßriger Lösung keine Fluoreszenz zeigen.

Die Emission der Fluoreszenz geschieht immer aus dem ersten angeregten Zustand, der zum einen durch die Elektronenstruktur zum anderen durch Umwelteinflüsse bedingt ist. Für die Emission kommt nur Fluoreszenzlicht zwischen 400 und 500 nm in Betracht, meistens wird der violette Bereich von 420 oder 450 nm benutzt (nach Ziolkowsky, Lit.: 46).

Optische Aufheller binden an Chitin und Zellulose, die auch Bestandteil der Zellwände von Pilzen sind. Man verwendet sie zur Vitalfluorochromierung oder zur Darstellung von Zellwandstoffen in histologischen Präparaten. Früher wurde zu diesem Zweck Calcofluorweiß CFW M2R als Fluorochrom verwendet, das spezifisch an Hexapyranose-Polymere in 1S_0 -Konfiguration bindet. Es steht jedoch nicht mehr zur Verfügung.

BPBA 267 $\frac{1}{2}$ hat eine ähnliche Molekularstruktur (siehe Abbildung 4, Seite 19) wie CFW M2R. Holländer *et al.* untersuchten BPBA auf seine Bindungseigenschaften nach dem Test von Maeda und Ishida. Es zeigte sich, daß BPBA in allen sieben Substraten, die geprüft wurden, die gleichen Bindungseigenschaften aufweist wie CFW M2R: Es färben sich Carboxymethylzellulose, Chitin, Diäthylaminoäthylzellulose und Zellulose an, während α -konfigurierte Polysaccharide wie Stärke, Glycogen und Sephadex keine Anfärbung aufweisen.

4. Die Färbemethoden

Als Fluorochrom wurde der optische Aufheller BPBA in 2 verschiedenen Lösungen eingesetzt: BPBA 0,2% und BPBA 0,04%, dem DMSO zugesetzt worden war. Holländer et al. entwickelten 2 Färbemethoden: eine für histologische Schnitte, die andere für Haut-, Haar- und Nagelproben. Beide Färbetechniken von *Holländer et al.* wurden in dieser Arbeit übernommen. Die Zubereitung und Anwendung der BPBA-Lösungen erfolgte laut nachstehendem Schema (aus Lit.: 20).

a) *Färbemethode für Haar-, Haut- und Nagelproben:*

1. 0,04 g BPBA werden in 90 ml 0,5 M NaOH aufgelöst und 10 ml Dimethylsulfoxid (= DMSO) zugefügt.
2. Die zu untersuchenden Partikel werden auf einem Objektträger in diese Lösung gegeben und mit einem Deckglas versehen.
3. Das Präparat kann sofort untersucht werden.

b) *Färbemethode für histologische Schnitte oder Kulturgewebe:*

1. 0,2 g BPBA werden in 100 ml 0,1 M NaOH aufgelöst.
2. Die Färbung erfolgt in dieser Lösung für 5 Minuten
3. Die Präparate werden 4 mal in Schalen mit destilliertem Wasser gebracht.
4. Wenn Dauerpräparate hergestellt werden sollen, werden die Präparate in destilliertem Wasser aufbewahrt oder dehydriert und in einem fluoreszenzfreien Medium aufbewahrt.

5. Das Untersuchungsgut

Zur Verfügung standen Haar-, Haut- und Nagelproben von Patienten der Dermatologischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München. Es handelte sich um Patienten sowohl aus der Frauen- als auch aus der Männerambulanz bzw. Poliklinik, bei denen im Rahmen der klinischen Untersuchung der Verdacht auf eine Pilzinfektion auftrat. Sie wurden dem mykologischen Labor zur weiteren Diagnostik zugeführt.

Dort wurde aus dem verdächtigen Bezirk mit dem Skalpell Material in Form von Hautschüppchen, Haaren oder Nagelspänen entnommen und in verschließbaren Plastikdöschen aufbewahrt. Wenn pro Patient genügend Untersuchungsmaterial vorhanden war, wurde der eine Teil mit der üblichen Routinediagnostik des mykologischen Labors mit Hilfe der Kalilaugenpräparation untersucht, der andere zur Anfertigung von Kulturen verwendet, die zur Kontrolle der mikroskopischen Ergebnisse herangezogen wurden. Ein weiterer Teil stand der zu diskutierenden fluoreszenzmikroskopischen Methode zur Verfügung.

Zehn sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch routinediagnostisch sicher pilzpositive und mengenmäßig ausreichende Untersuchungsproben wurden in verschließbaren Plastikdöschen vier Wochen lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Am Entnahmetag, nach einer, zwei und vier Wochen wurde von allen zehn Proben je ein Teil mit Kalilauge und BPBA 0,2% bzw. mit BPBA 0,04% und DMSO fluorochromiert und am Auflichtfluoreszenzmikroskop untersucht.

Aus weiteren dreißig Untersuchungsproben, die mittels der Routinediagnostik als pilzpositiv erkannt worden waren, wurden dreißig Kalilaugenpräparate mit BPBA 0,2% fluorochromiert sowie dreißig Präparate mit BPBA 0,04% und DMSO hergestellt. Alle angefertigten Präparate wurden anschließend mit Lack versiegelt. Diese Präparate wurden bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer aufbewahrt und in folgenden Zeitabständen untersucht: am Entnahmetag, nach ein, zwei und drei Tagen, nach einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben und acht Wochen.

Von 1976 bis 1980 wurde von zehn Patienten, bei denen der klinische Verdacht auf eine tiefreichende Mykose geäußert worden war, Hautmaterial entnommen und histologische, mit Para-Aminosalicylsäure (PAS) gefärbte Präparate zum Pilznachweis angefertigt. Jeweils ein Leerschnitt wurde zum Vergleich dazu mit BPBA 0,2% nach der Färbemethode für histologische Schnitte (siehe Kapitel C, Punkt 4 b) angefertigt.

6. Die Kalilaugenpräparation

Dem Schuppenmaterial auf dem Objektträger wird ein Tropfen 20%-ige Kalilauge zugesetzt und vorsichtig über der Flamme des Bunsenbrenners erhitzt. Nach einer Einwirkzeit von ungefähr einer Stunde zur Quellung der Epithelzellen wird das Präparat mit dem Deckglas ein wenig gequetscht und im Hellfeldmikroskop der Firma Carl Zeiss bei 100- und 250-facher Vergrößerung mäanderförmig durchgemustert.

7. Die Fluoreszenz-Mikrophotographie

Die Fotoaufnahmen wurden mit dem Grundkörper Orthomat der Firma E. Leitz und der eingebauten vollautomatischen Mikroskop-Kamera durchgeführt. Da wegen der Wiedergabe der spezifischen Fluoreszenzfarbe Farbfilme den Schwarz-Weiß-Filmen vorzuziehen sind und die Fluoreszenzfarben am besten auf Tageslichtfilmen abgebildet werden, fand der Tageslichtfilm Kodak Ektachrom 400 mit einer Empfindlichkeit nach DIN 27 bzw. ASA 400 Verwendung.

D. Untersuchungen und Ergebnisse

1. Vergleichende Untersuchung zwischen Nativpräparaten und BPBA fluorochromierten Präparaten

Das von den Patienten gewonnene Probenmaterial wurde nach 3 verschiedenen Methoden untersucht:

- a) Nach der Kalilaugenpräparierung wurden 200 Nativpräparate im Hellfeldmikroskop durchgemustert.
- b) Diese 200 Nativpräparate wurden anschließend mit BPBA 0,2% versetzt und im Auflichtfluoreszenzmikroskop betrachtet.
- c) Aus dem Originaluntersuchungsmaterial wurden 200 mit BPBA 0,04% fluorochromierte Präparate angefertigt und ebenfalls im Auflichtfluoreszenzmikroskop durchgemustert.

Von den 200 Nativpräparaten wurden 72 als pilzpositiv, 128 als pilznegativ erkannt. Bei den 200 mit BPBA 0,2% behandelten Präparaten wurden 79 als pilzpositiv und 121 als negativ diagnostiziert. Die 200 mit BPBA 0,04% und DMSO fluorochromierten Präparate waren 80 mal pilzpositiv und 120 mal negativ (siehe unten Tabelle 1 und Anhang 1, Seite 55 ff.).

Pilznachweis	KOH	BPBA 0,2%	BPBA 0,04%
positiv	72	79	80
negativ	128	121	120

Tabelle 1: *Häufigkeit des positiven Pilznachweises
mittels mikroskopischer Methoden*

2. Gegenüberstellung der mikroskopischen Ergebnisse und der Kulturbefunde

Den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchungen wurden die Resultate der aus dem Untersuchungsmaterial angelegten Kulturen gegenübergestellt. Insgesamt sechsmal wurde aufgrund der Morphologie die Verdachtsdiagnose "Malassezia furfur" mikroskopisch bestätigt, was auch am Fluoreszenzmikroskop (siehe Abbildung 5, Seite 29) eindeutig nachvollzogen werden konnte:

Typisch für "Malassezia furfur" ist die Präsenz von Hyphen mit 2,5 bis 4 µm Durchmesser und variabler Länge zusammen mit runden oder ovalen Einzelzellen von 3 bis 7 µm Durchmesser (aus Lit: 33).

In diesen sechs Fällen wurden - wie allgemein üblich - keine Kulturen angelegt, so daß sich die Anzahl der zu vergleichenden Präparate auf 194 reduziert. Damit ergibt sich folgendes korrigiertes Verhältnis beim Pilznachweis:

Pilznachweis	KOH	BPBA 0,2%	BPBA 0,04%
positiv	66	73	74
negativ	128	121	120

Tabelle 2: Häufigkeit des positiven Pilznachweises.
Vergleich der mikroskopischen Ergebnisse
mit dem Kulturbefund.

Konnte in der angelegten Kultur der Pilznachweis nach einem Zeitraum von 4-6 Wochen nicht geführt werden, so galten die als pilzpositiv bewerteten Präparate als "falsch positiv". Wurden jedoch im Präparat keine Pilze gefunden, die Kultur zeigte hingegen Pilzwachstum, so mußten diese Präparate als "falsch negativ" eingestuft werden. Dabei ist festzuhalten, daß in einigen Fällen eine Vorbehandlung der erkrankten Hautbezirke oder eines Teils davon durch den Patienten selbst nicht auszuschließen war.

Es zeigte sich, daß bei den Nativpräparaten 15 Objekte falsch positiv und 18 falsch negativ beurteilt worden waren. Von den Präparaten, die mit BPBA 0,2% fluorchromiert worden waren, waren 10 falsch positiv und 6 falsch negativ beurteilt worden. Bei den mit BPBA 0,04% und DMSO behandelten Präparaten betrug die Anzahl der falsch positiven 10, während 4 als falsch negativ betrachtet wurden (siehe unten Tabelle 3 und Anhang 1, Seite 55 ff.).

Pilznachweis	KOH	BPBA 0,2% 0,04%	BPBA
falsch positiv	15	10	10
falsch negativ	18	6	4
zusammen	33	16	14

Tabelle 3: Gegenüberstellung der falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse aufgrund der kulturellen Kontrollbefunde

Bei den falsch negativen Nativpräparaten waren mit elf falschen Resultaten am häufigsten die Hefen nicht erkannt worden. *Candida famata* konnte fünfmal, *Candida albicans* dreimal sowie *Cc. species*, *parapsilosis* und *guillermondii* jeweils einmal mikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Bei der Fluorochromierung mit BPBA 0,2% zeigte sich, daß bei den Hefen *Candida fumata* zweimal und *C.parapsilosis* einmal nicht erkannt wurden (siehe unten Tabelle 4 und Anhang 2, Seite 60 ff.).

kultureller Nachweis	negativ mit KOH	negativ mit BPBA 0,2%	negativ mit BPBA 0,04%
<u>1. Hefen</u>			
<i>C. famata</i>	5	2	2
<i>C. albicans</i>	3	-	-
<i>C. species</i>	1	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	1
<i>C. guillermondii</i>	1	-	-
<u>2. Schimmelpilze</u>	4	3	2
<u>3. Trichophyten</u>			
<i>Trich. rubrum</i>	2	-	-
<i>Trich. beigelii.</i>	1	-	-
gesamt	18	6	5

Tabelle 4: Gegenüberstellung der 18 falsch negativen Nativpräparate mit den jeweiligen Kulturergebnissen. Im Vergleich dazu Nachweishäufigkeit bei BPBA-Anfärbung.

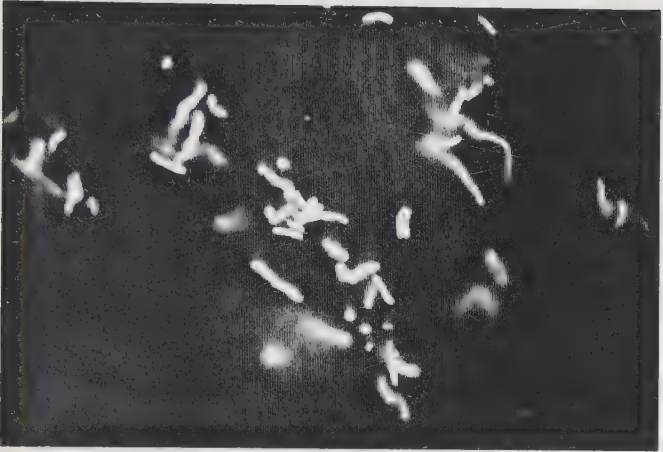


Abbildung 5: *Malassezia furfur*
BPBA 0,04 %;
Auflichtfluoreszenz-Mikroskop, 100-fach



Abbildung 6: *Hyphe mit wenig sichtbaren Zellen*
im Hintergrund
BPBA 0,04 %; Auflichtfluoreszenzmikroskop,
250-fach

Die Färbung mit BPBA 0,04% erbrachte dasselbe Ergebnis. Weiter konnten im Nativpräparat Schimmelpilze viermal, *Trich. rubrum* zweimal und *Trich. beigeli* einmal nicht beobachtet werden, während in den fluorochromierten Präparaten nur der Nachweis von Schimmelpilzen mit BPBA 0,2% dreimal, mit BPBA 0,04% zweimal nicht gelang (siehe Tabelle 4, Seite 28 und Anhang 2, Seite 60 ff.).

3. Vergleich des Pilznachweises bei 200 mit BPBA 0,2% fluorochromierten Präparaten im Durchlicht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskop

Bei der Beobachtung der mit BPBA 0,2% fluorochromierten Präparate im Durchlichtmikroskop zeigte sich, daß der Pilznachweis mit der üblicherweise verwendeten 100- oder 250-fachen Vergrößerung nicht geführt werden konnte. Man benötigte dazu die 400-fache Vergrößerung, was zu einer lichtschwachen Abbildung führte. Am Auflichtmikroskop reichte meistens bereits die 100-fache Vergrößerung aus.

Im Durchlichtmikroskop wurden 68 Präparate pilzpositiv und 132 pilznegativ beurteilt, im Auflichtmikroskop diagnostizierte man 71 pilzpositive und 129 negative Präparate (siehe unten Tabelle 5 und Anhang 3, Seite 63 ff.).

Pilznachweis	Durchlichtmikroskop	Auflichtmikroskop
positiv	68	71
negativ	132	129

Tabelle 5: *Pilznachweis bei BPBA 0,2 % fluorochromierten Präparaten im Durchlicht- bzw. Auflichtmikroskop*

Im Auflichtmikroskop waren die Pilzelemente leichter nachweisbar als im Durchlichtmikroskop, da die Mycelien - bei gleichermaßen wenig sichtbaren Zellen im Hintergrund - eine deutlich intensivere Fluoreszenz zeigten (siehe Tabelle 5, Seite 30 und Abbildung 6, Seite 29). Sie fielen deshalb bereits bei Betrachtung der Präparate in der Übersichtsvergrößerung mit großem Gesichtsfeld auf, so daß die Durchmusterung rascher erfolgen konnte als im Durchlichtmikroskop.

4. Vergleich des Pilznachweises bei 200 mit BPBA 0,04%
fluorochromierten Präparaten im Durchlicht- bzw.
Auflichtfluoreszenzmikroskop

200 Präparate wurden mit BPBA 0,04% und DMSO behandelt und im Durchlichtmikroskop betrachtet. 194 mal waren keine Pilzstrukturen bei 100- bzw. 250-facher Vergrößerung erkennbar. Auch bei Verwendung der 400-fachen Vergrößerung und ausgiebigster Durchmusterung konnten keine fluoreszierenden Pilzelemente gesehen werden. Bei den sechs als pilzpositiv bezeichneten Präparaten war zwar eine Abbildung von fluoreszierenden Pilzstrukturen erkennbar, sie fiel jedoch deutlich schwächer aus als bei der Verwendung von BPBA 0,2%.

Im Auflichtmikroskop wurden von den gleichen Präparaten 72 als positiv und 128 als negativ eingestuft. Die Pilzstrukturen waren auch bei der 0,04%-igen BPBA-Lösung bereits in der Übersicht klar erkennbar, die anderen Zellstrukturen traten wie am Durchlichtmikroskop kaum sichtbar in den Hintergrund.



Abbildung 7: Hyphe (*Trich. rubrum*)

BPBA 0,04%; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
250-fach



Abbildung 8: Mycel (*Trich. rubrum*)

BPBA 0,04 %; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
100-fach

Die Hyphen zeigten deutliche Septierung, die Mycelien fluoreszierten intensiv bei ausgezeichneter Brillanz (siehe Abbildung 7 und 8, Seite 32). Dadurch war eine rasche Durchmusterung und eindeutige Zuordnung pilz-positiv/pilznegativ möglich (siehe unten Tabelle 6 und Anhang 4, Seite 66).

Pilznachweis	Durchlichtmikroskop	Auflichtmikroskop
positiv	6	72
negativ	194	128

Tabelle 6: *Pilznachweis bei BPBA 0,04% fluorochromierten Präparaten im Durchlicht- bzw. Auflichtmikroskop*

5. Prüfung der Pilznachweisbarkeit des vier Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrten Untersuchungsmaterials bei Fluorochromierung mit BPBA 0,2% bzw. BPBA 0,04%

Bei der Betrachtung der mit BPBA 0,2% fluorochromierten Präparate im Auflichtfluoreszenzmikroskop stellte sich heraus, daß Abbildungsqualität und Fluoreszenzintensität über den Beobachtungszeitraum von vier Wochen gleich gut blieben. Auch in der vierten Woche nach Entnahme des Untersuchungsmaterials fluoreszierten die Dermatophyten noch deutlich und waren hinsichtlich ihrer Morphologie eindeutig als Hyphen zu erkennen (siehe Abbildung 9, Seite 34).

Bis einschließlich der zweiten Woche gelang im gesamten Untersuchungsmaterial der Pilznachweis. Erst in der vierten Woche konnten bei einer Probe auch nach



Abbildung 9: Mycel (*Trich. rubrum*)

BPBA 0,2%; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
100-fach

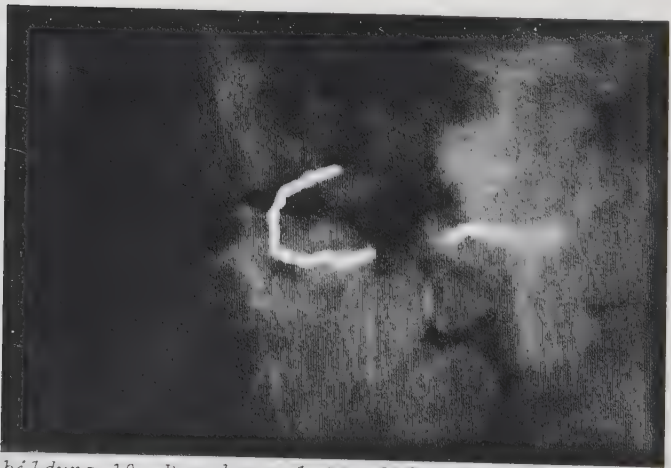


Abbildung 10: Pseudomycel (*Candida albicans*)

BPBA 0,04%; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
250-fach

Durchmusterung eines zusätzlich angefertigten Kontrollpräparates keine fluoreszierenden Pilzfilamente gefunden werden (siehe Anhang 5, Seite 67).

Die mit BPBA 0,04% fluorochromierten Proben zeigten ebenfalls eine gleichbleibend sehr gute Brillanz der fluoreszierenden Pilzstrukturen (siehe Abbildung 10, Seite 34). Es konnte - wie bei den mit BPBA 0,2% fluorochromierten Präparaten - in der vierten Woche nach Materialentnahme bei neun Proben der Pilznachweis in konstanter Abbildungsqualität erfolgen. Die einzige Probe, bei der keine fluoreszierenden Pilzelemente gefunden werden konnten, stammte aus dem gleichen Untersuchungsmaterial, bei dem auch mit 0,2%-iger BPBA-Lösung nach vier Wochen kein Pilznachweis zu führen war (siehe Anhang 6, Seite 67).

6. Prüfung der Pilznachweisbarkeit bei 30 mit BPBA 0,2% fluorochromierten und versiegelten Präparaten im Verlauf von acht Wochen

Es zeigte sich, daß in den ersten drei Wochen bei allen dreißig mit BPBA 0,2% fluorochromierten Kalilaugenpräparaten die fluoreszierenden Pilzstrukturen im Auflichtfluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden konnten.

In der vierten Woche wurden in einem der Präparate keine fluoreszierenden Pilzfäden mehr gefunden. Nach sechs Wochen zeigte ein weiteres Präparat keine fluoreszierenden Pilzelemente mehr. In der siebten Woche erhöhte sich die Anzahl der "negativ" gewordenen Präparate auf vier. Schließlich fanden sich nach acht Wochen noch in 24 Präparaten fluoreszierende Pilzstrukturen, in sechs Präparaten konnten keine fluoreszierenden Pilzfilamente mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13, Seite 38 und Anhang 7, Seite 68).

Es erwies sich im Laufe der Zeit jedoch als zunehmend schwierig, die Präparate durchzumustern, da trotz der Versiegelung mit Lack die Kalilauge auskristallisierte und zu fluoreszierenden Artefakten führte (siehe Abbildungen 11 und 12, Seite 37). Diese waren zwar aufgrund der Morphologie leicht von den Pilzstrukturen zu differenzieren, doch hoben sich die fluoreszierenden Pilzelemente nicht mehr so deutlich gegen den nun ebenfalls leuchtenden Untergrund ab.

7. Prüfung der Pilznachweisbarkeit bei 30 mit BPBA 0,04%
fluorochromierten und versiegelten Präparaten im
Verlauf von acht Wochen

Alle dreißig mit BPBA 0,04% fluorochromierten und versiegelten Präparate wiesen in den ersten drei Beobachtungswochen am Auflichtfluoreszenzmikroskop fluoreszierende Pilzelemente auf. Wie bei den mit BPBA 0,2% fluorochromierten, so konnten auch hier nach vier Wochen bei einem Präparat keine fluoreszierenden Pilzstrukturen mehr beobachtet werden. Nach einem Zeitraum von sieben Wochen waren bei vier Präparaten keine fluoreszierenden Pilzfäden mehr nachweisbar (siehe Abbildung 14, Seite 38). In der achten Woche waren sieben Präparate "negativ" geworden, bei 25 waren immer noch fluoreszierende Pilzelemente zu sehen (siehe Abbildungen 15 und 16, Seite 39 und Anhang 8, Seite 69).

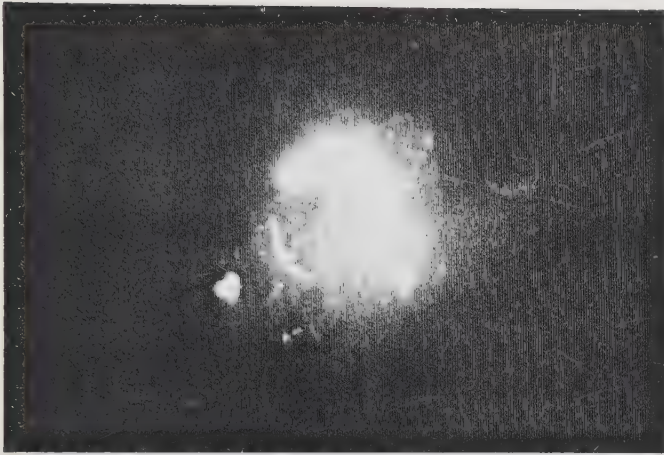


Abbildung 11: *Mycel (Trich. rubrum)*
BPBA 0,2%; Auflichtfluoreszenzmikroskop,
250-fach



Abbildung 12: *Auskristallisierte Kalilauge*
BPBA 0,2 %; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
400-fach

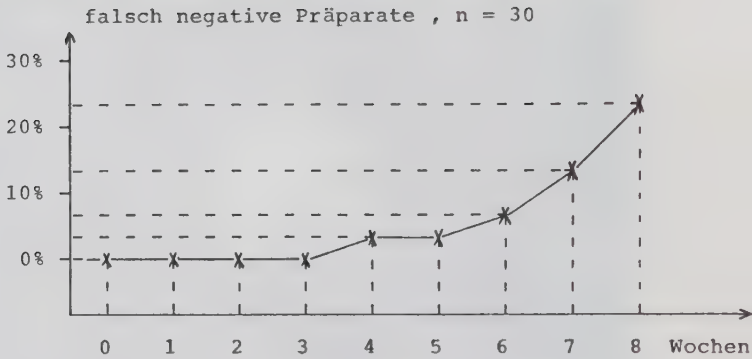


Abbildung 13: Prozentuale Abnahme des Pilznachweises bei wöchentlicher Kontrolle von versiegelten Präparaten mit BPBA 0,2 %

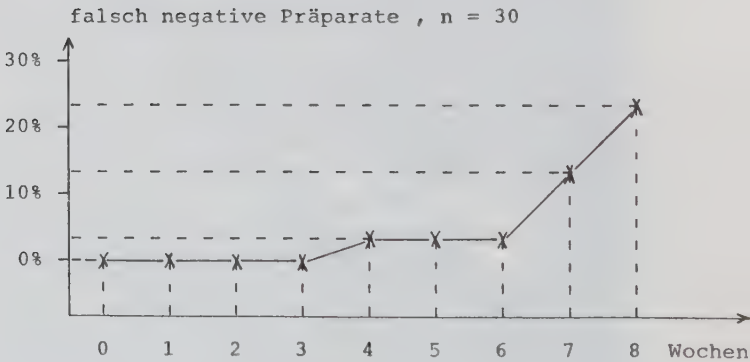


Abbildung 14: Prozentuale Abnahme des Pilznachweises bei wöchentlicher Kontrolle von versiegelten Präparaten mit BPBA 0,04 %

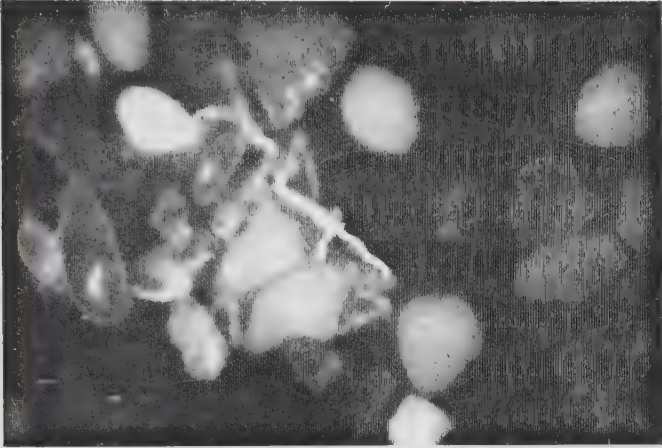


Abbildung 15: Hyphe nach 8 Wochen (*Trich. rubrum*)
BPBA 0,04 %; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
250-fach

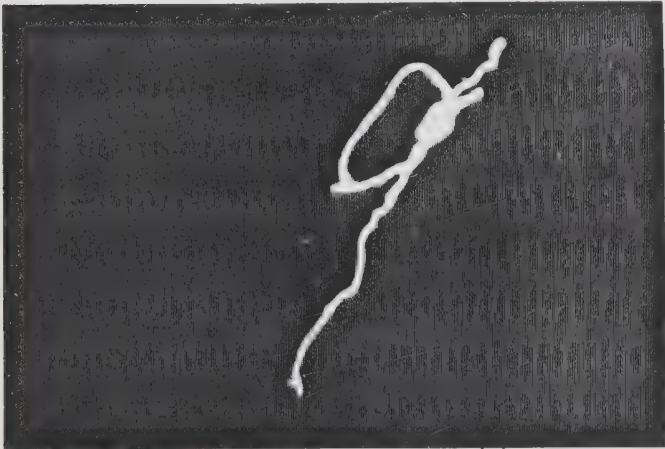


Abbildung 16: Mycel nach 8 Wochen (*Trich. mentagrophytes*) EFA 0,04%;
Auflichtfluoreszenzmikroskop, 250-fach

Im Unterschied zu den mit BPBA 0,2% fluorochromierten Kalilaugenpräparaten traten bei den mit BPBA 0,04% und DMSO behandelten Präparaten keine Artefaktbildungen im Sinne von fluoreszierenden Kristallen auf, so daß die Durchmusterung dadurch nicht erschwert wurde. Die Abbildungsqualität blieb konstant. Die Intensität der Fluoreszenz wurde im Verlauf der acht Wochen kaum wesentlich geringer, es waren eindeutig fluoreszierende Pilzelemente erkennbar.

8. Vergleichende Untersuchungen zwischen mit PAS bzw. BPBA gefärbten histologischen Präparaten

Bei den zehn mit PAS gefärbten histologischen Präparaten wurden am Lichtmikroskop fünfmal Pilzstrukturen beobachtet. Sie zeigten eine rötliche Färbung der Zellwand und ließen sich schnell und einfach erkennen. Die fünf anderen Präparate konnten sowohl zum jeweiligen Entnahmedatum als auch während der Verwendung des Materials in dieser Arbeit den klinischen Verdacht auf eine tiefreichende Mykose nicht bestätigen.

Von den mit BPBA 0,2% fluorochromierten Präparaten wiesen vier fluoreszierende Pilzelemente auf, deren Nachweis am Auflichtfluoreszenzmikroskop eindeutig war. Das im fünften Fall zur Kontrolle angefertigte zweite BPBA-Präparat zeigte bei der Durchmusterung keine fluoreszierenden Pilzfilamente. Es mußten also sechs Präparate als pilznegativ bezeichnet werden (siehe Tabelle 7, Seite 41). Für diesen Untersuchungspunkt standen leider keine weiteren Präparate zur Verfügung.

Nr.	Jahrgang	PAS	BPBA 0,2 %
1	1976	-	-
2	1976	-	-
3	1976	-	-
4	1978	-	-
5	1978	-	-
6	1978	+	-
7	1979	+	+
8	1980	+	+
9	1980	+	+
10	1980	+	+

*Tabelle 7: Pilznachweis bei histologischen Präparaten;
Vergleich PAS-Färbung und Färbung mit
BPBA 0,2%*

9. Differenzierung zwischen Pilzzellen und Artefakten

Artefakte können die Durchmusterung der Nativpräparate erschweren, da sie die gleiche Helligkeit wie die Pilzstrukturen bzw. Epithelzellen aufweisen. Wie bereits in Kapitel D, Punkt 6 angemerkt wurde, erschweren sie auch die Durchmusterung der fluoro-chromierten Präparate. Meistens entstehen diese Artefakte durch Auskristallisieren der Kalilauge bei den mit BPBA 0,2% fluoro-chromierten Präparaten oder durch Verunreinigung der Präparate mit Pollen, Sporen, Papierfuseln oder sehr häufig mit Baumwollfädchen. Diese Substanzen zeigen alle Anfärbbarkeit mit dem Fluorochrom und fluoreszieren in ähnlicher Weise wie die zu untersuchenden Pilzstrukturen.



Abbildung 17: Wollfaden;
BPBA 0,04 %; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
250-fach

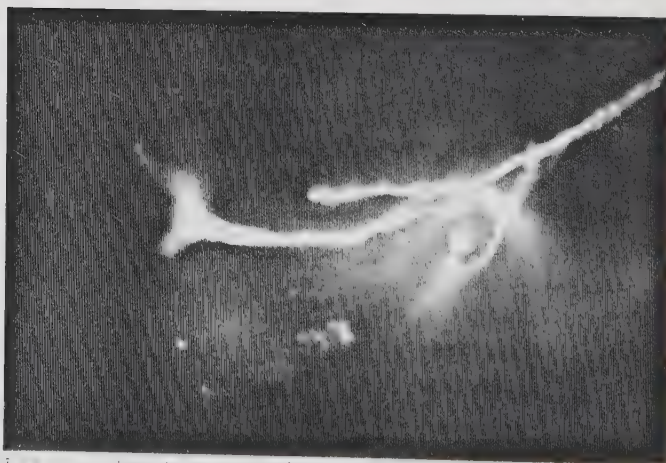


Abbildung 18: Wollfaden (Wollfaden, rubrum),
BPBA 1,54%; Auflichtfluoreszenz-Mikroskop,
250-fach

In den meisten Fällen lassen sich diese Artefakte jedoch morphologisch leicht von Pilzen unterscheiden, fehlt ihnen doch die Septierung wie bei Hyphen oder sie sind größer als Pilzelemente (siehe Abbildungen 17 und 18, Seite 42).

Mosaikfungi, die bei der Durchmusterung des Nativpräparates eine besondere Schwierigkeit bezüglich ihrer Differenzierung darstellen, färben sich mit dem Fluorochrom nicht an, so daß damit eine Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

E. Diskussion

Wie die Untersuchungen und Ergebnisse gezeigt haben, kann der optische Aufheller Blankophor BA 267% als Fluorochrom in der mykologischen Diagnostik angewendet werden.

Es soll nun dargestellt werden, welche Aussagen sich machen lassen hinsichtlich der Grenzen dieser Methode und ob sie in der Routinediagnostik des mykologischen Labors Eingang finden kann.

Abbildungsqualität der Präparate

Im fluorochromierten Präparat findet man nach Verschieben der zur Anregung nötigen Erregerfilter und des entsprechenden Sperrfilters grünlich-blau bis bläulich aufleuchtende, scharf begrenzte Zellwände von Pilzfilamenten. Sie heben sich deutlich von dem dunkel bleibenden Hintergrund mit wenig sichtbaren umgebenden Zellen ab. Die Pilzstrukturen fallen bereits in der Übersicht vor allem wegen ihrer Fluoreszenz aber auch aufgrund ihrer Morphologie ins Auge.

Im Nativpräparat fällt es dagegen oft schwer, eine eindeutige Diagnose zu stellen, da sich im unruhig wirkenden Zellverband die kontrastarmen Pilzfäden meist kaum abheben und die zarten Strukturen im einfarbig hellen Präparat nur mit Mühe erkannt werden können. Sproßpilze, wie zum Beispiel Hefen, treten im Schuppenmaterial der Nativpräparate kaum in Erscheinung, so daß über diese Nativpräparate oft keine sichere Aussage gemacht werden kann.

Bei den fluorochromierten Präparaten dagegen macht sich beim Nachweis von Sproßpilzen die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs an deren Zellwände besonders

hilfreich bemerkbar. So zeigen auch Hefen und andere Sproßpilze am Auflichtfluoreszenzmikroskop eine brillante grünlich-blaue Fluoreszenz vor einem dunkel bleibenden Hintergrund, was die Durchmusterung und Befunderhebung wesentlich erleichtert und zuverlässiger macht.

Ein weiterer Vorteil der Fluorochromierung mit BPBA liegt in der Möglichkeit, mit Hilfe dieser Methode Aufbaustrukturen der Pilze klar und deutlich darzustellen.

Die Hyphen zeigen eine deutliche Septierung und durch Drehen an der Mikrometerschraube lassen sich die Pilzelemente oft bis zum Endseptum verfolgen.

Verwendbarkeit eines Durchlichtfluoreszenzmikroskops zum Pilznachweis bei Anwendung verschieden konzentrierter BPBA-Lösungen

Bei der Pilznachweisquote im Durchlichtfluoreszenzmikroskop läßt sich bei einem Vergleich zwischen der 0,2%-igen BPBA-Lösung und der 0,04%-igen BPBA-Lösung folgendes feststellen:

Mit der höheren Konzentration der BPBA-Lösung fallen in der Übersichtsvergrößerung die Pilzelemente nicht eindeutig als fluoreszierende Strukturen auf. Trotzdem lassen sich nahezu alle Präparate, die Pilzfilamente enthalten, als "pilzpositiv" erkennen, da bei 400-facher Vergrößerung zwar schwächer aber dennoch eindeutig fluoreszierende Pilzstrukturen zu beobachten waren. Die Durchmusterung ist jedoch mit einem erheblich größeren Zeitaufwand verbunden, was einen Nachteil zur Nativpräparatuntersuchung darstellt.

Bei Betrachtung der mit der niedrigeren BPBA-Konzentration fluorochromierten Präparate zeigt sich, daß die

Pilzstrukturen sowohl in der Übersichtsvergrößerung als auch bei 400-facher Vergrößerung nicht eindeutig als fluoreszierende Filamente erkennbar sind, weshalb es nicht möglich ist, die Präparate aussagekräftig zu beurteilen. Wenn doch hin und wieder ein Präparat als pilzpositiv bezeichnet werden kann, so ist die Fluoreszenzintensität signifikant schwächer als bei den mit der höher konzentrierten BPBA-Lösung fluorochromierten Präparaten. Die niedrigere Konzentration der BPBA-Lösung kann nicht als geeignet bezeichnet werden, wenn der Pilznachweis am Durchlichtfluoreszenzmikroskop erfolgen soll.

Einsetzbarkeit des Auflichtfluoreszenzmikroskops zum Pilznachweis bei verschiedenen Konzentrationen der BPBA-Lösungen

Am Auflichtfluoreszenzmikroskop stellt man bei einem Vergleich zwischen der Verwendung der 0,2%-igen BPBA-Lösung und der 0,04%-igen BPBA-Lösung fest, daß die Pilzelemente in den Präparaten beider Konzentrationen eine brillante Fluoreszenz bei hohem Bildkontrast aufweisen. Bereits in der Übersicht ist es möglich, die fluoreszierenden Pilzstrukturen zu erkennen. Das Ergebnis "pilzpositiv" kann mit Hilfe der 250-fachen Vergrößerung noch einmal zur Kontrolle bestätigt werden.

Im Vergleich zur Durchmusterung von Nativpräparaten ist der Zeitaufwand bei der Arbeit am Auflichtfluoreszenzmikroskop wesentlich geringer.

Beide Konzentrationen eignen sich gleichermaßen zur Fluorochromierung und Betrachtung am Auflichtfluoreszenzmikroskop. Bei der Verwendung der höheren Konzentration werden jedoch - aufgrund der notwendigen

Vorbehandlung mit Kalilauge - öfter Artefakte im Sinne von auskristallisierter Kalilauge beobachtet als bei der Fluorochromierung mit der niedrigeren Konzentration, der als "Quellmittel" DMSO zugefügt ist. Dies ließe sich aber umgehen, indem man - analog wie bei der Herstellung der niedriger konzentrierten BPBA-Lösung - bei der Zubereitung der Fluorochrom-Lösung DMSO anstatt Kalilauge zufügt.

Unabhängig davon lassen die in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen erwarten, daß die Zahl der falsch negativen Ergebnisse durch den Einsatz von BPBA am Auflichtfluoreszenzmikroskop deutlich niedriger ausfällt als bei der Untersuchung der Nativpräparate am Hellfeldmikroskop.

Konstanz der Pilznachweisbarkeit bei fluorochromierten und versiegelten Präparaten

Da die Pilznachweisquote sowohl mit der höheren als auch mit der niedrigeren BPBA-Konzentration in den ersten drei Wochen konstant bleibt, eignen sich versiegelte Präparate grundsätzlich zur längeren Aufbewahrung in der feuchten Kammer. Als problematisch erweist sich die Vorbehandlung mit Kalilauge für die mit höher konzentrierter BPBA-Lösung fluorochromierten Präparate. Kalilauge kristallisiert trotz sorgfältiger Versiegelung der Präparate im Laufe der Zeit aus und führt zu hell grünlich-gelb fluoreszierenden Kristallartefakten, die sich aber morphologisch klar von Pilzstrukturen differenzieren lassen. Dennoch wird die Durchmusterung aufgrund des unruhig wirkenden und leuchtenden Hintergrundes erschwert und der Zeitaufwand für die Untersuchung dieser Präparate vergrößert sich deutlich.

Bei den Präparaten niedrigerer BPBA-Konzentration und DMSO-Zusatz ist keine Ausfällung oder Kristallisierung zu beobachten. Die Intensität der Fluoreszenz verringert sich im Lauf von zwei Monaten nur unwesentlich, so daß auch nach einem längeren Zeitraum die Durchmusterung einfach und schnell erfolgen kann. Diese Präparate eignen sich zur Aufbewahrung über mindestens drei Wochen, denn der Pilznachweis bleibt gleichermaßen gut und schnell möglich.

Histologische Präparate

Die histologischen Präparate können auch nach Jahren noch sehr schnell und einfach mit BPBA fluorochemiert werden. Die Identifizierung von Pilzstrukturen gelingt aufgrund der Fluoreszenz einwandfrei, auch wenn sich wegen der geringen Zahl der histologischen Präparate keine Aussage über die Zuverlässigkeit des Pilznachweises mit BPBA machen läßt. Im Vergleich zur PAS-Färbung ist der Zeitaufwand jedoch wesentlich geringer.

Pilznachweisbarkeit im aufbewahrten Untersuchungsmaterial

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß es durchaus möglich ist, Probenmaterial über zwei Wochen aufzubewahren, ohne daß falsch negative Resultate zu befürchten sind. Die Abbildungsqualität von Präparaten, die aus länger aufbewahrtem Material angefertigt sind, ist von gleicher Brillanz und Fluoreszenzintensität wie von Präparaten, die am Entnahmetag hergestellt sind, unabhängig davon, ob die höhere oder niedrigere BPBA-Konzentration verwendet wird.

Auffallend ist jedoch, daß in den meisten Fällen nur

mehr Bruchstücke von Hyphen zu betrachten waren, so daß die Durchmusterung etwas mehr Zeit in Anspruch nahm als die Untersuchung von sofort am Entnahmetag fluorochromierten Präparaten.

Man muß allerdings anmerken, daß von der zweiten auf die vierte Woche ein Präparat keine fluoreszierenden Pilzstrukturen mehr zeigte. Denkbar ist, daß sich in diesem Präparat die Struktur der Zellwand so verändert hat, daß das Fluorochrom keine Bindung mehr eingehen konnte.

Einsatzmöglichkeit der BPBA-Fluorochromierung in der mykologischen Diagnostik

Die Fluorochromierung von bereits angefertigten Kalilaugenpräparaten mit der höher konzentrierten BPBA-Lösung geht sehr schnell und einfach vor sich. Ist ein Fluoreszenzmikroskop vorhanden, so ist es möglich, die Nativpräparate mit BPBA zu fluorochromieren und am Fluoreszenzmikroskop nochmals durchzumustern. Diese Methode sollte vor allen Dingen dann zum Einsatz kommen, wenn die Nativpräparate am Hellfeldmikroskop nicht sicher zu beurteilen sind, sei es, daß Mosaikfungi auftreten oder die Beurteilung durch Artefakte erschwert wird. Am Fluoreszenzmikroskop lassen sich diese Erschwernisse leichter differenzieren und somit Fehldiagnosen vermeiden. Diese Fluorochromierungsmethode benötigt allerdings den gleichen Zeitaufwand wie die Herstellung von Nativpräparaten. Alle fluorochromierten Präparate lassen sich auch am Hellfeldmikroskop betrachten, wo sie wie die Nativpräparate ungefärbt und gleichmäßig hell erscheinen.

Folglich bietet sich an, Präparate mit der niedrigeren BPBA-Konzentration, der als "Quellmittel" DMSO zuge-

setzt wird, zu fluorochromieren. Die Färbemethode ist schnell und einfach und diese Präparate können dann sofort am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Einwirkzeit der Kalilauge auf die Epithelzellen entfällt. Diese Arbeitsmethode würde sich also besonders für die Routine- und Sofortdiagnostik im mykologischen Labor eignen. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, lassen sich Pilzstrukturen mit Hilfe der BPBA-Fluorochromierung schnell, einfach und sicher nachweisen.

Obwohl man die Aufbaustrukturen der Pilzfilamente klar und deutlich erkennen kann, läßt es sich nicht umgehen, Kulturen von dem Probenmaterial anzufertigen, da es nur mittels der Beurteilung der Kulturergebnisse möglich ist, die Dermatophyten genau zu typologisieren. Da die BPBA-Fluorochromierung nur dort eingesetzt werden kann, wo ein in der Anschaffung und im Unterhalt doch recht kostspieliges Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung steht, bleibt es abzuwarten, ob diese Methode in die Routinediagnostik Eingang finden wird.

F. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob der optische Aufheller Blankophor BA 267% (BPBA) in der mykologischen Diagnostik eingesetzt werden kann. Dabei war insbesondere die Zuverlässigkeit des Pilznachweises im Vergleich zur Nativpräparatdiagnostik, die Abbildungsqualität an verschiedenen Fluoreszenzmikroskopsystemen, die Aufbewahrungsmöglichkeit sowohl von Untersuchungsmaterial als auch von Präparaten und die Herstellung von histologischen Präparaten von Bedeutung. Die durchgeführten Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, mit welcher Aussagekraft und in welchen Grenzen die Fluorochromierung eingesetzt werden kann.

Die Untersuchungen wurden mit Blankophor BA 267% (BPBA), einem kommerziellen Weißmacher der Firma Bayer Leverkusen, als Fluorochrom durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen angewendet: BPBA 0,2%, bei dem als Vorbehandlung zum Quellen der Epithelzellen der Einsatz von Kalilauge notwendig war, und BPBA 0,04% mit Dimethylsulfoxid als Quellmittel. Nach dem Prinzip der sekundären Fluoreszenz wird an die Zellwand von nicht fluoreszierenden Objekten, wie in diesem Fall den Pilzfilamenten, der Fluoreszenzfarbstoff BPBA angelagert. Im Fluoreszenzmikroskop fallen die so markierten Strukturen durch intensives Aufleuchten auf.

Zur Betrachtung der angefertigten Präparate standen zwei Fluoreszenzmikroskope unterschiedlicher Prinzipien zur Verfügung: ein Dunkelfeld-Durchlichtfluoreszenzmikroskop und ein Auflichtfluoreszenzmikroskop. Die Durchmusterung der Präparate erfolgte am Auflicht-

fluoreszenzmikroskop durchwegs mit der 100 bzw. 250-fachen Vergrößerung, am Dunkelfeld-Durchlichtfluoreszenzmikroskop mußte zusätzlich die 400-fache Vergrößerung verwendet werden.

Im Zeitraum von Februar bis November 1984 wurden insgesamt 890 Präparate angefertigt und untersucht. Das Untersuchungsmaterial stammte von Patienten sowohl aus der Frauen- als auch aus der Männerambulanz der Dermatologischen Poliklinik der Universität München. Als Ergebnisse der durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und der anschließend vorgenommenen Auswertung lassen sich folgende Feststellungen machen:

- Die Verwendung von BPBA erweist sich als eine einfache und schnelle Methode zum Pilznachweis in der Dermatologie.
- Die Fluoreszenzfärbung mit BPBA 0,2% erfolgte unter Weiterverwendung von Kalilaugenpräparaten und eignet sich daher vor allem zur Kontrolluntersuchung bei unsicherem Ergebnis des Kalilaugenpräparates.
- Im Vergleich zur Herstellung von Kalilaugenpräparaten ist der Zeitaufwand für die Anfertigung von mit BPBA 0,04% und Dimethylsulfoxid behandelten Präparaten deutlich geringer und bietet zudem die Möglichkeit zur mykologischen Sofortdiagnostik.
- Mittels der Fluorochromierung mit BPBA ist die Ausbeute an positivem Pilzmaterial am Fluoreszenzmikroskop höher als bei der Durchmusterung von Nativpräparaten im Hellfeldmikroskop.

- Die Durchmusterung der fluorochromierten Präparate am Auflichtfluoreszenzmikroskop kann aufgrund der deutlichen und klaren Abbildungsqualität schneller und einfacher erfolgen als die von Nativpräparaten im Hellfeldmikroskop.
- Die lichtschwache Abbildung von fluoreszierenden Pilzstrukturen und die Notwendigkeit, zur sicheren Beurteilung fluoreszierender Objekte die 400-fache Vergrößerung zu verwenden, die mit einem größeren Zeitaufwand für die Durchmusterung verbunden ist, lassen das Dunkelfeld-Durchlichtmikroskop - ebenso wie der Nachteil, daß die mit der niedrigeren BPBA-Konzentration fluorochromierten Präparate nicht beurteilbar sind - als nicht geeignet für diese Methode erscheinen.
- Die mit BPBA 0,2% fluorochromierten, versiegelten und in der feuchten Kammer aufbewahrten Kalilaugenpräparate erscheinen wegen der Auskristallisierung der Kalilauge und somit der Artefaktbildung zur längeren Aufbewahrung nicht geeignet.
- BPBA 0,2% eignet sich zum Pilznachweis bei histologischen Präparaten.
- Versiegelte und mit BPBA 0,04% und DMSO behandelte Präparate lassen sich bei gleichbleibender Abbildungsqualität und Fluoreszenzintensität längere Zeit in der feuchten Kammer aufbewahren.
- Der Pilznachweis ist mit beiden Färbemethoden auch nach Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials über einen Zeitraum von zwei Wochen noch klar und deutlich möglich.

- Mittels der Fluorochromierung sowohl mit BPBA 0,2% als auch mit BPBA 0,04% läßt sich die Anzahl falsch negativer Präparate, vor allem bei dem Nachweis von Sproßpilzen, deutlich reduzieren.

- Artefakte, wie zum Beispiel Wollfäden oder Erschwernisse bei der Differenzierung von Mosaikfungi im Kalilaugenpräparat treten zwar auch in den fluorochromierten Präparaten auf, lassen sich dort aber in der Regel aufgrund der Morphologie bzw. fehlenden Fluoreszenz unproblematisch und eindeutig als solche erkennen.

Anhang 1: Übersicht über die Ergebnisse der Nativpräparate (KOH), der BPBA fluorochromierten Präparate (0,2% bzw. 0,04%) und dem Kulturbefund

Nr.	Lokalisation	KOH	0,2% + KOH	0,04% + DMSO	Kultur (Pilzart)
1	Fingernagel	-	-	-	-
2	Zehennagel	-	-	-	-
3	Kopf	-	-	-	-
4	Stamm	+	+	+	O (Malassezia furfur)
5	Wange	-	-	-	-
6	Fußsohle	-	-	-	-
7	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
8	Zehenzw.raum	+	+	+	C. guillermondii
9	Zehenzw.raum	-	-	-	-
10	Fingerzw.raum	-	-	-	-
11	Stamm	-	-	-	-
12	Fingernagel	-	-	-	-
13	Hand	-	-	-	-
14	Fußsohle	-	-	-	-
15	Fußsohle	-	-	-	C. famata
16	Hand	-	-	-	C. parapsilosis
17	Fußsohle	-	-	-	-
18	Zehenzw.raum	-	-	-	-
19	Zehennagel	-	-	-	-
20	Füße	-	-	-	-
21	Hand	-	-	-	-
22	Achsel	-	-	-	Schimmelpilze
23	Leistenbeuge	-	-	-	Schimmelpilze
24	Zehenzw.raum	+	+	+	Schimmelpilze
25	Stamm	-	-	-	-
26	Zehennagel	-	-	-	-
27	Hand	-	-	-	-
28	Zehennagel	-	-	-	-
29	Leistenbeuge	-	-	-	-
30	Fingerzw.raum	-	-	-	-
31	Fingernagel	+	-	-	-
32	Hand	+	+	+	-
33	Zehenzw.raum	-	+	+	Trich. rubrum
34	Fußsohle	+	+	+	C. albicans
35	Zehennagel	+	+	+	C. albicans
36	Zehenzw.raum	-	+	+	C. guillermondii
37	Fußsohle	+	+	+	-
38	Zehenzw.raum	-	-	-	-
39	Fußsohle	-	-	-	-
40	Zehennagel	-	-	-	-

Fortsetzung Anhang 1: Übersicht über die Ergebnisse der Nativpräparate (KOH), der BFBA fluorochromierten Präparate (0,2% bzw. 0,04%) und dem Kulturbefund

Nr.	Lokalisation	KOH	0,2% + KOH	0,04% + DMSO	Kultur (Pilzart)
41	Hand	+	+	+	Trich. rubrum
42	Zehennagel	-	-	-	-
43	Fußsohle	-	-	-	-
44	Hand	-	-	-	-
45	Zehennagel	-	-	-	-
46	Ellbogen	+	+	+	Trich. rubrum
47	Nacken	+	+	+	Trich. rubrum
48	Hand	-	+	+	Schimmelpilze
49	Hand	-	-	-	-
50	Zehenzw.raum	-	-	-	-
51	Fußsohle	-	-	-	-
52	Unterschenkel	-	-	-	-
53	Stamm	-	-	+	Schimmelpilze
54	Nacken	-	-	-	-
55	Oberarm	-	-	-	-
56	Finger	-	-	-	-
57	Zehennagel	-	-	-	-
58	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. mentagrophytes
59	Hand	-	-	-	-
60	Haar	-	-	-	-
61	Zehenzw.raum	-	-	-	-
62	Leistenbeuge	+	+	+	C. albicans
63	Kopf	-	-	-	-
64	Kopf	-	-	-	-
65	Wange	-	-	-	-
66	Zehennagel	+	-	-	-
67	Fußsohle	-	-	-	-
68	Zehennagel	-	-	-	-
69	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
70	Achsel	-	-	-	-
71	Gesicht	-	-	-	-
72	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
73	Fußsohle	+	+	+	Trich. rubrum
74	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
75	Thorax	-	+	+	-
76	Kopf	-	-	-	-
77	Fußsohle	-	-	-	-
78	Zehennagel	-	-	-	-
79	Stamm	-	-	-	-
80	Zehennagel	-	-	-	C. famata

Fortsetzung Anhang 1: Übersicht über die Ergebnisse der Nativpräparate (KOH), der BPBA fluorochromierten Präparate (0,2% bzw. 0,04%) und dem Kulturbefund

Nr.	Lokalisation	KOH	0,2% + KOH	0,04% + DMSO	Kultur (Pilzart)
81	Zehenzw.raum	-	+	+	C. famata
82	Fußsohle	-	+	+	C. famata
83	Zehennagel	+	+	+	Trich. mentagrophytes
84	Fußsohle	-	-	-	-
85	Stamm	-	-	-	-
86	Haarbalg	-	-	-	-
87	Zehennagel	-	-	-	-
88	Fußsohle	-	-	-	-
89	Fingernagel	+	+	+	Trich. rubrum
90	Hand	+	+	+	Trich. rubrum
91	Fingerzw.raum	-	-	-	-
92	Zehenzw.raum	+	+	+	-
93	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
94	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
95	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
96	Zehennagel	+	+	+	-
97	Leistenbeuge	+	+	+	C. famata
98	Leistenbeuge	+	+	+	Epidermophyton flocc.
99	Arme	-	-	-	-
100	Leistenbeuge	+	+	+	Trich. rubrum
101	Stamm	-	-	-	-
102	Fußsohle	-	-	-	-
103	Zehennagel	+	+	+	Schimmelpilz
104	Zehenzw.raum	-	-	-	-
105	Fußsohle	-	-	-	-
106	Hand	-	-	-	-
107	Kopf	-	-	-	-
108	Fußsohle	-	-	-	-
109	Hand	-	-	-	-
110	Fingernagel	-	-	-	-
111	Haar	-	-	-	-
112	Zehennagel	-	-	-	-
113	Fußsohle	-	-	-	-
114	Hand	-	-	-	-
115	Zehenzw.raum	+	+	+	O (Malassezia furfur)
116	Stamm	+	+	+	O (Malassezia furfur)
117	Fußsohle	-	-	-	-
118	Fingernagel	-	-	-	-
119	Fuß	-	-	-	-
120	Zehenzw.raum	-	-	-	-

Fortsetzung Anhang 1: Übersicht über die Ergebnisse der Nativpräparate (KOH), der BFBA fluorchromierten Präparate (0,2% bzw. 0,04%) und dem Kulturbefund

Nr.	Lokalisation	KOH	0,2% + KOH	0,04% + DMSO	Kultur (Pilzart)
121	Hand	-	-	-	-
122	Fingernagel	-	-	-	-
123	Finger	-	-	-	-
124	Fußsohle	+	-	-	-
125	Fußsohle	-	-	-	-
126	Zehennagel	-	-	-	-
127	Leistenbeuge	+	+	+	Trich. rubrum
128	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
129	Fußsohle	+	+	+	Trich. rubrum
130	Zehennagel	+	+	+	-
131	Zehennagel	-	-	-	-
132	Hand	-	-	-	-
133	Zehenzw.raum	-	+	+	C. famata
134	Zehennagel	-	-	-	-
135	Unterschenkel	+	+	+	Trich. rubrum
136	Zehennagel	+	+	+	-
137	Brustheiß	-	-	-	-
138	Haarbalg	-	-	-	-
139	Fingernagel	-	-	-	-
140	Hand	-	-	-	-
141	Zehenzw.raum	-	-	-	-
142	Leistenbeuge	-	-	-	-
143	Leistenbeuge	-	-	-	-
144	Fußsohle	+	+	+	C. parapsilosis
145	Zehennagel	-	+	+	C. albicans
146	Zehenzw.raum	-	+	+	C. albicans
147	Wange	-	-	-	-
148	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
149	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
150	Leistenbeuge	-	-	-	-
151	Fingernagel	-	-	-	-
152	Stamm	+	+	+	O (Malassezia furfur)
153	Stamm	+	+	+	O (Malassezia furfur)
154	Hand	-	+	+	C. species
155	Haarbalg	-	-	-	-
156	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
157	Fußsohle	+	+	+	Trich. rubrum
158	Zehenzw.raum	-	-	-	-
159	Hand	-	-	-	-
160	Hand	-	+	+	Trich. beigellii

Fortsetzung Anhang 1: Übersicht über die Ergebnisse der Mutiprüparate (KOH), der BPBA fluorochromierten Präparate (0,2% bzw. 0,04%) und dem Kulturbefund

Nr.	Lokalisation	KOH	0,2% + KOH	0,04% + DMSO	Kultur (Pilzart)
161	Fuß	+	+	+	Trich. rubrum
162	Finger	-	-	-	-
163	Fingernagel	-	-	-	-
164	Achsel	+	+	+	Trich. rubrum
165	Leistenbeuge	-	+	+	Trich. rubrum
166	Hand	-	-	-	-
167	Haarbalg	-	-	-	-
168	Hand	+	+	+	Trich. rubrum
169	Fingernagel	+	+	+	-
170	Achsel	-	-	-	-
171	Fingernagel	+	+	+	Trich. rubrum
172	Gesäß	+	+	+	Trich. rubrum
173	Haarbalg	-	-	-	-
174	Unterschenkel	-	-	-	-
175	Fingernagel	-	-	-	-
176	Zehennagel	+	+	+	Rhodotorula rubra
177	Fußsohle	+	+	+	Trich. rubrum
178	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
179	Fingernagel	+	+	+	Trich. rubrum
180	Hand	+	+	+	Trich. rubrum
181	Zehenzw.raum	+	+	+	Trich. rubrum
182	Zehenzw.raum	+	-	-	-
183	Zehennagel	+	-	-	-
184	Fingernagel	+	+	+	-
185	Kinn	-	-	-	-
186	Unterarm	+	+	+	Trich. rubrum
187	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
188	Hand	+	+	+	Trich. rubrum
189	Zehenzw.raum	+	+	+	Tr.rubrum/C.albicans
190	Leistenbeuge	+	+	+	Trich. rubrum
191	Zehenzw.raum	-	-	-	-
192	Hand	-	-	-	-
193	Fingernagel	+	+	+	-
194	Unterschenkel	-	-	-	-
195	Zehennagel	+	-	-	-
196	Unterschenkel	-	-	-	-
197	Leistenbeuge	-	+	+	C. albicans
198	Fußsohle	+	+	+	Trich. rubrum
199	Zehennagel	+	+	+	Trich. rubrum
200	Rücken	+	+	+	O (Malassezia furfur)

Anhang 2: Vergleich zwischen Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (D) und
Auflichtfluoreszenzmikroskopie (A) unter Verwendung von
RFB 0,2%

Nr.	Lokalisation	D	A	Nr.	Lokalisation	D	A
1	Fingernagel	-	-	36	Zehenzw.raum	+	+
2	Zehennagel	-	-	37	Fußsohle	+	+
3	Kopf	-	-	38	Zehenzw.raum	-	-
4	Stamm	+	+	39	Fußsohle	-	-
5	Wange	-	-	40	Zehennagel	-	-
6	Fußsohle	-	-	41	Hand	+	+
7	Zehennagel	+	+	42	Zehennagel	-	-
8	Zehenzw.raum	-	+	43	Fußsohle	-	-
9	Zehenzw.raum	-	-	44	Hand	-	-
10	Fingerzw.raum	-	-	45	Zehennagel	-	-
11	Stamm	-	-	46	Nacken	+	+
12	Fingernagel	-	-	47	Ellbogen	+	+
13	Hand	-	-	48	Hand	+	+
14	Fußsohle	-	-	49	Hand	-	-
15	Fußsohle	-	-	50	Zehenzw.raum	-	-
16	Hand	-	-	51	Fußsohle	-	-
17	Fußsohle	-	-	52	Unterschenkel	-	-
18	Zehenzw.raum	-	-	53	Stamm	-	-
19	Zehennagel	-	-	54	Nacken	-	-
20	Füße	-	-	55	Oberarm	-	-
21	Hand	-	-	56	Finger	-	-
22	Achsel	-	-	57	Zehennagel	-	-
23	Leistenbeuge	-	-	58	Zehenzw.raum	+	+
24	Zehenzw.raum	+	+	59	Hand	-	-
25	Stamm	-	-	60	Haarbalg	-	-
26	Zehennagel	-	-	61	Zehenzw.raum	-	-
27	Hand	-	-	62	Zehennagel	+	+
28	Zehennagel	-	-	63	Leistenbeuge	+	+
29	Leistenbeuge	-	-	64	Kopf	-	-
30	Fingerzw.raum	-	-	65	Kopf	-	-
31	Fingernagel	-	-	66	Wange	-	-
32	Hand	+	+	67	Fußsohle	-	-
33	Zehenzw.raum	+	+	68	Zehennagel	-	-
34	Fußsohle	+	+	69	Zehenzw.raum	+	+
35	Zehennagel	+	+	70	Achsel	-	-

Fortsetzung Anhang 2: Vergleich zwischen Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (D) und Auflichtfluoreszenzmikroskopie (A) unter Verwendung von BPBA 0,2%

Nr.	Lokalisation	D	A	Nr.	Lokalisation	D	A
71	Gesicht	-	-	106	Hand	-	-
72	Zehennagel	+	+	107	Kopf	-	-
73	Fußsohle	+	+	108	Fußsohle	-	-
74	Zehenzw.raum	+	+	109	Hand	-	-
75	Thorax	-	+	110	Fingernagel	-	-
76	Leistenbeuge	-	-	111	Haar	-	-
77	Fußsohle	-	-	112	Zehennagel	-	-
78	Zehennagel	-	-	113	Fußsohle	-	-
79	Stamm	-	-	114	Hand	-	-
80	Zehennagel	-	-	115	Zehenzw.raum	-	+
81	Zehenzw.raum	+	+	116	Stamm	-	+
82	Fußsohle	+	+	117	Brust	-	-
83	Zehennagel	+	+	118	Fingernagel	-	-
84	Fußsohle	-	-	119	Fuß	-	-
85	Stamm	-	-	120	Zehenzw.raum	-	-
86	Haarbalg	-	-	121	Hand	-	-
87	Zehennagel	-	-	122	Fingernagel	-	-
88	Fußsohle	-	-	123	Finger	-	-
89	Fingernagel	+	+	124	Fußsohle	-	-
90	Hand	+	+	125	Fußsohle	-	-
91	Fingerzw.raum	-	-	126	Zehennagel	-	-
92	Zehenzw.raum	+	+	127	Leistenbeuge	-	-
93	Zehennagel	+	+	128	Zehenzw.raum	-	+
94	Zehenzw.raum	+	+	129	Fußsohle	-	+
95	Zehennagel	+	+	130	Zehennagel	-	+
96	Zehennagel	+	+	131	Zehennagel	-	-
97	Leistenbeuge	+	+	132	Fußsohle	-	+
98	Leistenbeuge	+	+	133	Fußsohle	-	+
99	Arme	-	-	134	Zehenzw.raum	+	+
100	Leistenbeuge	+	+	135	Fußsohle	-	-
101	Stamm	-	-	136	Zehennagel	-	-
102	Fußsohle	-	-	137	Zehenzw.raum	+	+
103	Zehennagel	-	+	138	Leistenbeuge	-	-
104	Zehenzw.raum	-	-	139	Gesäß	-	-
105	Fußsohle	-	-	140	Hand	-	+

Fortsetzung Anhang 2: Vergleich zwischen Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (D) und Auflichtfluoreszenzmikroskopie (A) unter Verwendung von BPBA 0,2%

Nr.	Lokalisation	D	A	Nr.	Lokalisation	D	A
141	Leistenbeuge	-	-	171	Zehenzw.raum	-	+
142	Zehenzw.raum	-	+	172	Zehennagel	-	+
143	Fußsohle	-	-	173	Hand	-	+
144	Hand	-	-	174	Zehenzw.raum	-	+
145	Hals	-	-	175	Stamm	-	-
146	Gesäß	-	-	176	Zehennagel	-	-
147	Zehenzw.raum	-	-	177	Zehennagel	-	-
148	Fußsohle	-	-	178	Zehennagel	-	-
149	Zehenzw.raum	-	+	179	Stamm	-	-
150	Fuß	-	+	180	Zehenzw.raum	-	-
151	Fußrücken	-	+	181	Zehennagel	-	-
152	Leistenbeuge	-	-	182	Fingernagel	-	-
153	Hals	-	+	183	Hodensack	-	-
154	Haarbalg	-	-	184	Hals	-	-
155	Zehenzw.raum	-	-	185	Zehenzw.raum	-	-
156	Fußsohle	-	-	186	Zehenzw.raum	-	-
157	Zehenzw.raum	-	+	187	Fußsohle	-	-
158	Hand	-	-	188	Haarbalg	-	-
159	Zehennagel	-	+	189	Zehenzw.raum	-	+
160	Fingernagel	-	+	190	Fußsohle	-	-
161	Unterschenkel	-	-	191	Fußsohle	-	+
162	Zehennagel	-	-	192	Zehennagel	-	+
163	Zehenzw.raum	-	-	193	Hand	-	+
164	Hand	-	-	194	Fußsohle	-	-
165	Rücken	-	-	195	Zehennagel	-	-
166	Zehenzw.raum	-	+	196	Zehenzw.raum	-	+
167	Fußsohle	-	+	197	Fußsohle	-	+
168	Zehennagel	-	+	198	Zehennagel	-	+
169	Hand	-	-	199	Leistenbeuge	+	+
170	Fuß	+	+	200	Zehenzw.raum	+	+

Anhang 3: Vergleich zwischen Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (D) und
Auflichtfluoreszenzmikroskopie (A) unter Verwendung von
BPBA 0,04%

Nr.	Lokalisation	D	A	Nr.	Lokalisation	D	A
1	Fingernagel	-	-	36	Zehenzw.raum	-	+
2	Zehennagel	-	-	37	Fußsohle	-	+
3	Kopf	-	-	38	Zehenzw.raum	-	-
4	Stamm	-	-	39	Fußsohle	-	-
5	Wange	-	-	40	Zehennagel	-	-
6	Fußsohle	-	-	41	Hand	-	+
7	Zehennagel	-	+	42	Zehennagel	-	-
8	Zehenzw.raum	-	+	43	Fußsohle	-	-
9	Zehenzw.raum	-	-	44	Hand	-	-
10	Fingerzw.raum	-	-	45	Zehennagel	-	-
11	Stamm	-	-	46	Nacken	-	+
12	Fingernagel	-	-	47	Ellbogen	-	+
13	Hand	-	-	48	Hand	-	+
14	Fußsohle	-	-	49	Hand	-	-
15	Fußsohle	-	-	50	Zehenzw.raum	-	-
16	Hand	-	-	51	Fußsohle	-	-
17	Fußsohle	-	-	52	Unterschenkel	-	-
18	Zehenzw.raum	-	-	53	Stamm	-	+
19	Zehennagel	-	-	54	Nacken	-	-
20	Füße	-	-	55	Oberarm	-	-
21	Hand	-	-	56	Finger	-	-
22	Achsel	-	-	57	Zehennagel	-	-
23	Leistenbeuge	-	-	58	Zehenzw.raum	-	+
24	Zehenzw.raum	-	+	59	Hand	-	-
25	Stamm	-	-	60	Haarbalg	-	-
26	Zehennagel	-	-	61	Zehenzw.raum	-	-
27	Hand	-	-	62	Zehennagel	-	+
28	Zehennagel	-	-	63	Leistenbeuge	-	+
29	Leistenbeuge	-	-	64	Kopf	-	-
30	Fingerzw.raum	-	-	65	Kopf	-	-
31	Fingernagel	-	-	66	Wange	-	-
32	Hand	-	-	67	Fußsohle	-	-
33	Zehenzw.raum	-	+	68	Zehennagel	-	-
34	Fußsohle	-	+	69	Zehenzw.raum	-	+
35	Zehennagel	-	+	70	Achsel	-	-

Fortsetzung Anhang 3: Vergleich zwischen Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (D) und Auflichtfluoreszenzmikroskopie (A) unter Verwendung von BPBA 0,04%

Nr.	Lokalisation	D	A	Nr.	Lokalisation	D	A
71	Gesicht	-	-	106	Hand	-	-
72	Zehennagel	-	+	107	Kopf	-	-
73	Fußsohle	-	+	108	Fußsohle	-	-
74	Zehenzw.raum	-	+	109	Hand	-	-
75	Thorax	-	+	110	Fingernagel	-	-
76	Leistenbeuge	-	-	111	Haar	-	-
77	Fußsohle	-	-	112	Zehennagel	-	-
78	Zehennagel	-	-	113	Fußsohle	-	-
79	Stamm	-	-	114	Hand	-	-
80	Zehennagel	-	-	115	Zehenzw.raum	-	+
81	Zehenzw.raum	+	+	116	Stamm	-	+
82	Fußsohle	+	+	117	Brust	-	-
83	Zehennagel	-	+	118	Fingernagel	-	-
84	Fußsohle	-	-	119	Fuß	-	-
85	Stamm	-	-	120	Zehenzw.raum	-	-
86	Haarbalg	-	-	121	Hand	-	-
87	Zehennagel	-	-	122	Fingernagel	-	-
88	Fußsohle	-	-	123	Finger	-	-
89	Fingernagel	-	+	124	Fußsohle	-	-
90	Hand	-	+	125	Fußsohle	-	-
91	Fingerzw.raum	-	-	126	Zehennagel	-	-
92	Zehenzw.raum	-	+	127	Leistenbeuge	-	-
93	Zehennagel	-	+	128	Zehenzw.raum	-	+
94	Zehenzw.raum	-	+	129	Fußsohle	-	+
95	Zehennagel	-	+	130	Zehennagel	-	+
96	Zehennagel	-	+	131	Zehennagel	-	-
97	Leistenbeuge	-	+	132	Fußsohle	-	+
98	Leistenbeuge	-	+	133	Fußsohle	-	+
99	Arme	-	-	134	Zehenzw.raum	+	+
100	Leistenbeuge	-	+	135	Fußsohle	-	-
101	Stamm	-	-	136	Zehennagel	-	-
102	Fußsohle	-	-	137	Zehenzw.raum	+	+
103	Zehennagel	-	+	138	Leistenbeuge	-	-
104	Zehenzw.raum	-	-	139	Gesäß	-	-
105	Fußsohle	-	-	140	Hand	-	+

Fortsetzung Anhang 3: Vergleich zwischen Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (D) und Auflichtfluoreszenzmikroskopie (A) unter Verwendung von BFBA 0,04%

Nr.	Lokalisation	D	A	Nr.	Lokalisation	D	A
141	Leistenbeuge	-	-	171	Zehenzw.raum	-	+
142	Zehenzw.raum	-	+	172	Zehennagel	-	+
143	Fußsohle	-	-	173	Hand	-	+
144	Hand	-	-	174	Zehenzw.raum	-	+
145	Hals	-	-	175	Stamm	-	-
146	Gesäß	-	-	176	Zehennagel	-	-
147	Zehenzw.raum	-	-	177	Zehennagel	-	-
148	Fußsohle	-	-	178	Zehennagel	-	-
149	Zehenzw.raum	-	+	179	Stamm	-	-
150	Fuß	-	+	180	Zehenzw.raum	-	-
151	Fußrücken	-	+	181	Zehenrangel	-	-
152	Leistenbeuge	-	-	182	Fingernagel	-	-
153	Hals	-	+	183	Hodensack	-	-
154	Haarbalg	-	-	184	Hals	-	-
155	Zehenzw.raum	-	-	185	Zehenzw.raum	-	-
156	Fußsohle	-	-	186	Zehenzw.raum	-	-
157	Zehenzw.raum	-	+	187	Fußsohle	-	-
158	Hand	-	-	188	Haarbalg	-	-
159	Zehennagel	-	+	189	Zehenzw.raum	-	+
160	Fingernagel	-	+	190	Fußsohle	-	-
161	Unterschenkel	-	-	191	Fußsohle	-	+
162	Zehennagel	-	-	192	Zehennagel	-	+
163	Zehenzw.raum	-	-	193	Hand	-	+
164	Hand	-	-	194	Fußsohle	-	-
165	Rücken	-	-	195	Zehennagel	-	-
166	Zehenzw.raum	-	+	196	Zehenzw.raum	-	+
167	Fußsohle	-	+	197	Fußsohle	-	+
168	Zehennagel	-	+	198	Zehennagel	-	+
169	Hand	-	-	199	Leistenbeuge	+	+
170	Fuß	-	+	200	Zehenzw.raum	+	+

Anhang 4: Übersicht über die Kulturergebnisse bei falsch
negativen Nativpräparaten. Zum Vergleich die
Ergebnisse bei BPBA- Fluorochromierung

KOH	Kulturergebnis	BPBA 0,2%	BPBA 0,04%
-	+ Hefen C.famata	-	-
-	+ Hefen C.parapsilosis	-	-
-	+ Schimmelpilz	-	-
-	+ Trich. rubrum	+	+
-	+ C. guillermondii	+	+
-	+ Schimmelpilz	+	+
-	+ Schimmelpilz	-	+
-	+ C. famata	-	-
-	+ C. famata	+	+
-	+ C. famata	+	+
-	+ C. famata	+	+
-	+ C. albicans	+	+
-	+ C. albicans	+	+
-	+ C. species	+	+
-	+ Tr. beigl.	+	+
-	+ Tr. rubrum	+	+
-	+ C. albicans	+	+

Anhang 5: Pilznachweis bei über 4 Wochen aufbewahrtem Original-Untersuchungsmaterial; BPBA 0,2 %; Zimmertemperatur

Nr.	Lokalisation	BPBA 0,2 %				
		KOH	sof.	1 Wo.	2 Wo.	4 Wo.
1	Zehenzw.raum	+	+	+	+	+
2	Stamm	+	+	+	+	+
3	Zehennagel	+	+	+	+	+
4	Zehenzw.raum	+	+	+	+	+
5	Gesicht	+	+	+	+	+
6	Fußsohle	+	+	+	+	-
7	Fußsohle	+	+	+	+	+
8	Gesäß	+	+	+	+	+
9	Fußsohle	+	+	+	+	+
10	Zehennagel	+	+	+	+	+

Anhang 6: Pilznachweis bei über 4 Wochen aufbewahrtem Original-Untersuchungsmaterial; BPBA 0,04%; Zimmertemperatur

Nr.	Lokalisation	BPBA 0,04%				
		KOH	sof.	1 Wo.	2 Wo.	4 Wo.
1	Zehenzw.raum	+	+	+	+	+
2	Stamm	+	+	+	+	+
3	Zehennagel	+	+	+	+	+
4	Zehenzw.raum	+	+	+	+	+
5	Gesicht	+	+	+	+	+
6	Fußsohle	+	+	+	+	-
7	Fußsohle	+	+	+	+	+
8	Gesäß	+	+	+	+	+
9	Fußsohle	+	+	+	+	+
10	Zehennagel	+	+	+	+	+

Anhang 8: Pilznachweis über 8 Wochen bei versiegelten Präparaten, Fluorochromierung mit BEFA 0,04%

[illegible]

Literaturverzeichnis

1. ALLAN, R.A., MILLER, J.J.:
Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole.
Canad.J.Microbiolog., Ottawa, 26, 1980: 912-920
2. AUGER, P., MARQUIS, G., DALLAIRE, L.:
Viability Assessment by Dye Exclusion. A Fluorescent Method for Fungal Cells.
Arch.Derm. 115, 1979: 1195-1196
3. BECKER, E:
Fluoreszenzmikroskopie, Grundlagen, Instrumente, Anwendungen
E. Leitz Wetzlar GmbH, III, 1985
4. BRAUNSTEINER, H., GRABNER, N., PAKESCH, F.:
Die Fluoreszenzmikroskopie und ihre Verwertbarkeit in der Medizin.
Wien.Z.Jun. Med., 33, 1952: 276-289
5. CALICH, V.L.G., PURCHIO, A., PAULA, C.R.:
A New Fluorescent Viability Test for Fungi Cells.
Mykopathologia Vol. 66,3, 1978: 175-177
6. CHICK, E.W., DURHAM, N.C.:
Acridine Orange Fluorescent Stain for Fungi.
Archives of Dermatology 83, 1961: 305-309

7. CHICK, E.W., BEHAR, V.S.:
A Simple Fluorescent Method for the Detection of Superficial Fungi in Skin and Hair.
J. Invest. Derm., 37, 1961: 103-105
8. CONANT, N.:
Manual of Clinical Mycology
Saunders Co. Philadelphia 2. Aufl. 1954: 288-291, 318-321
9. DANGL, F.:
Bemerkungen zur Vitalfluorochromierung mit Akridinorange.
Mikroskop. 5, 1950: 140-142
10. DARKEN, M.A.:
Applications of fluorescent brighteners in biological techniques.
Science 133, 1961: 1704-1705
11. DARKEN, M.A.:
Absorption and Transport of Fluorescent Brighteners by Microorganisms.
Appl. Microbiol., 10, 1962: 387-393
12. FLEGEL H.:
Fluoreszenzmikroskopischer Pilznachweis.
Zschr. Haut-Geschl.-Krankheiten 17, 1954: 319-320
13. GRIDLEY, M.F.:
A Stain for Fungi in Tissue Sections.
Am. J. Clin. Path., 23, 1953: 303-307

14. GROCOTT, R.G.:
A Stain for Fungi in Tissue Sections and Smears: Using Gomori's methenamine-silver nitrate technique.
Am. J. Clin. Path., 25, 1955: 975-979

15. HAITINGER, M.:
Fluoreszenzmikroskopie
Akad. Verlag Leipzig, 2. Auflage, 1959

16. HARRINGTON, B.J., RAPER, K.B.:
Use of a Fluorescent Brightener to Demonstrate Cellulose in the Cellular Slime Molds.
Appl. Microbiol., 16, 1968: 106-113

17. HAUPTMANN, S., GRAEFE, J., REMANE, H.:
Lehrbuch der organischen Chemie
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig,
1980: 711

18. HERTH, W.:
Calcofluor White and Congo Red Inhibit Chitin Microfibril Assembly of Poterioochromonas: Evidence for a Gap between Polymerization and Microfibril Formation.
J.Cell Biol., 78, 1980: 442-450

19. HICKS, J.D., MATTHAEI, E.:
A selective fluorescent stain for mucin.
J. Path. Bact. 75, 1958: 473 f.

20. HOLLÄNDER, H., KEILIG, W., BAUER, J., ROTHMUND E.:
A reliable fluorescent stain for fungi in tissue sections and clinical specimens.
Mycopathologia, 88, 1984: 131-134
21. HUGHES, J., McCULLY, M.E.:
The Use of an optic brightener in the study of plant structure.
Stain Technol., 50, 1975: 319-329
22. JANKE, D.:
Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Pilzen in der menschlichen Hornschicht.
Klin. Wochenschr., 29, 1951: 326-327
23. JEFFERIES, C.J., BELCHER, A.R.:
A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo.
Stain Technol., 49, 1974: 199-202
24. JOHANNES H.:
Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien III. Die Vitalfärbung von Pycomyces Blakesteemus mit Akridinorange.
Arch. Mikrobiolog., 15, 1950: 13-41
25. JOHNSON, B.F., YOO, B.Y., CALLEJA, G.B.:
Cell division in yeasts. II. Template control of cell wall biogenesis in Schizosaccharomyces pombe.
In: PADILLA, G.M., CAMERON, I.L., ZIMMERMANN, A.:
Cell Cycle Controls
Academic Press, N.Y. 1974

26. KADEN, R.:
Fluoreszenzmikroskopische Studien zur Darstellung und zum Nachweis von Pilzelementen.
In: Humanpathogene Pilze im Tier- und Pflanzenreich
(Hrsg.: GÖTZ H., RIETH H.), Grosse Verlag Berlin,
1969: 15-18
27. KADEN, R.:
Die Agarblock Methode zum Studium pathogener Pilze
In: Zschr. Haut-Geschl.-Krk., 16, 1954: 170-173
28. KADEN R.:
Pilzanastomosen im Phasenkontrastmikroskop.
Mykopathologia 7, Den Haag, 1956: 328-332
29. KAPLAN, W., KRAFT, D.:
Demonstration of pathogenic fungi in formalin-fixed tissues by immunfluorescence.
Amer. J. Clin. Path. Vol. 52 No. 4, 1969: 420-437
30. KLIGMAN, A. M., MESCON, H., DE LAMATER, E.D.:
The Hotchkiss-McManus stain for the histopathologic diagnosis of fungus diseases.
Am. J. Clin. Path., 21, 1951: 86-91
31. KROG, N.:
Die Fluoreszenzmikroskopie in der Lebensmittelindustrie.
Inform. Carl Zeiss, 49, 1963: 86

32. LAVIČKA, M., HORYNA, B.:
Use of fluorescence methods for detecting fungi in animal tissues.
Veterinářství 51 (2), 1981: 76-77 (CS, 6 fig.)
Review of Med. and Vet. Mycology Vol. 17, No. 1, 1982
33. LENNETTE, E.H., SPAULDING, E.H., TRUANT, J.P.:
Manual of Clinical Microbiology,
2nd Edition, Am.Soc.Microbiol., Washington D.C., 1974
34. MAEDA, H., ISHIDA, N.:
Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener.
J. Biochem., 62, 1967: 276-278
35. MURGATROYD, L. B.:
2-Hydroxistilbamidine isethionate: a new fluorochrome for use in general pathology. II. the selective demonstration of fungi.
Diagnostic Histopathology, Vol.5, 1982: 219-222
36. NAGATA, T., TAKEBE, I.:
Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts.
Planta, 92, 1970: 301-308
37. PICKETT, J.P., BISHOP, C.M., CHICK, E.W., BAKER, R.D.:
A Simple Fluorescent Stain for Fungi.
Amer. J. Clin. Pathol., Vol. 34, No. 3, 1960: 197-202

38. PROWAZEK, S. von:
Über die Fluoreszenz der Zellen
Kleinwelt, 6, 1914: 39 f
39. QUADRIPUR, S.- A.:
Routine-Pilzdiagnostik mittels Vitalfluorochromierung.
Ärztl. Kosmethologie, 6, 1976: 50-53
40. RASKIN, J.:
Fluorescence Microscopy in the Study of Mycoses.
In: The Diagnosis and Treatment of Fungal Infections.
Hersg: ROBINSON jr., H.M.,
C.C. Thomas: Springfield, Illinois, 1974
41. RUSCH, H.-U.:
*Verbesserung des Pilznachweises durch
fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethoden.*
Dissertation der FU-Berlin, 1965
42. SCHÖNBORN, CHR.:
*Untersuchungen über den Wert der Fluoreszenzmikroskopie
für die Hefeschnelldiagnostik.*
Mykosen 4, 1964: 101-114
43. SEELIGER, H.P.R., HEYMER, T.:
*Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner
Umwelt.*
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1980

44. SIEGEL, J.I.:
Fluorescence microscopy
International Laboratory, Vol. 12, No. 8, 1982: 46-51
45. STRUGGER, S.:
Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie.
Schaper Verlag Hannover, 1949
46. ZIOLKOWSKY, B.:
Die Fluoreszenz der optischen Aufheller.
Seifen-Öle-Fette-Wachse 95.Jg. 19, 1969: 705-710

Lebenslauf

20.01.1960	geboren als Tochter des Bohrmeisters Wilhelm Graßl und der Hausfrau Sidonie Graßl, geb. Scheiber, in Murnau am Staffelsee
1966 - 1969	Volksschule Uffing am Staffelsee
1969 - 1970	Volksschule Seehausen
1970 - 1979	Mathematisch-naturwissenschaftliches Staffelsee-Gymnasium Murnau
1979	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1979 - 1985	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians Universität München
August 1981	Ärztliche Vorprüfung
August 1982	I. Staatsexamen
Februar 1983	Beginn des experimentellen Teiles der Doktorarbeit
August 1984	II. Staatsexamen
Oktober 1985	III. Staatsexamen
1986	Promotionsstudium Medizin an der Ludwig-Maximilians Universität München

Herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Hilfe und Unterstützung am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Herrn *Professor Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco* danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Dissertation an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München durchzuführen.

Herr *Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. M. Dorn* arbeitete mich in die Thematik ein und war während der gesamten Durchführung ein wichtiger Gesprächspartner.

Herr *Professor Dr. rer. nat. H. Holländer* vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München ermöglichte mir die Verwendung und Übernahme der Färbetechniken des dort zunächst getesteten Fluorochroms Blankophor BA 267%.

